

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
STEVE BOISVERT**

**ANALYSE QUANTITATIVE DE L'INDUCTION DE FLUORESCENCE
DU PHOTOSYSTÈME II : ÉNERGIE D'ACTIVATION APPARENTE
ET ORIGINE DE CHAQUE PHASE**

AVRIL 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche à la maîtrise pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire ainsi que pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche scientifique. Je remercie également toute l'équipe actuelle du laboratoire, Alain, David, Sri, Rémy et Johanne, qui sont d'une aide inestimable et contribuent à créer l'une des meilleures ambiances de travail que l'on puisse souhaiter dans un laboratoire. Il faut également dire un gros merci à Robert Drolet de l'atelier mécanique pour l'usinage des différentes pièces nécessaire à la cuvette.

Je dois également remercier ma famille, qui m'a aidé autant monétairement que moralement lorsque ça n'allait pas toujours bien dans mes expériences, les joies de la recherche ! Finalement, il faut dire un mot pour mes ami(e)s qui m'ont soutenu tout au long de mon cheminement et également à ma blonde qui a dû endurer mon humeur qui allait parfois au gré de la réussite des expériences de même que pour l'horaire parfois imprévisible du travail de laboratoire.

AVANT-PROPOS

David Joly fut le premier à travailler sur le projet, c'est également lui qui a mis au point certains des programmes informatisés automatisés afin de m'aider lors des analyses. L'aide technique d'Alain Gauthier, de par sa connaissance des circuits électriques et électroniques, fut également inestimable lors des différents montages expérimentaux. Alain et David ont également participé à l'interprétation des résultats.

J'ai effectué personnellement toutes les expériences, isolations de matériel photosynthétique de même que la majeure partie des analyses et, avec l'aide d'Alain Gauthier, le montage de la cuvette thermoajustable. J'ai également réalisé la majeure partie de la rédaction de l'article scientifique.

RÉSUMÉ DU PROJET

L'induction de fluorescence est une technique omniprésente en analyse photosynthétique de par le faible coût de l'appareillage, sa simplicité d'utilisation et la non-invasivité de la méthode. De plus, il est autant possible d'analyser des feuilles que des isolations de matériel photosynthétique.

Cependant, un problème persiste dans l'analyse des résultats des courbes d'induction de fluorescence : il y a peu de techniques d'analyse quantitative. En effet, dans la plupart des cas on analyse visuellement les courbes en comparant une courbe provenant d'un échantillon traité avec une courbe témoin. Ce type d'interprétation qualitative n'est pas très précis et, d'un auteur à l'autre, ce qui est considéré comme un changement significatif de la courbe d'induction de fluorescence peut être différent.

Le but du présent projet était de pallier à cette lacune dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence par le développement d'une nouvelle technique d'analyse quantitative. Par le fait même, une méthode d'analyse quantitative des phases des courbes d'inductions de fluorescence permettrait une tentative d'identification de l'origine de chacune des phases qui y sont représentées.

L'étude d'une technique quantitative d'analyse a requis la mise au point d'une cuvette maison où la température est réglable précisément et de façon stable. C'était la première phase du projet. Cela peut sembler simple, mais le contrôle efficace, stable et précis de la température dans une cuvette pouvant accueillir quatre millilitres de solution tout en étant également en mesure d'accepter la sonde du Plant Efficiency Analyser (PEA) de Hansatech s'est avéré une tâche ardue. En effet, plusieurs problèmes d'ordre technique sont apparus tout au long du développement de la cuvette.

Lorsque la cuvette fut finalement opérationnelle, les expériences avec des membranes thylacoïdiennes d'épinard témoins ont commencé. Il fallait maintenant mettre au point la technique d'analyse quantitative. Tout d'abord, à la température pièce,

nous avons testé la décomposition des courbes d'induction de fluorescence en trois composantes exponentielles distinctes, représentant trois cinétiques d'ordre 1, qui sont observées dans les courbes d'induction de fluorescence ; les phases O-J, J-I et I-P. Cette étape a été réalisée à l'aide de régressions non-linéaires effectuées par le logiciel informatique SigmaPlot. La décomposition s'avérant concluante, nous sommes parvenus à déterminer deux nouveaux paramètres quantitatifs : l'amplitude et la demi-vie et ce pour chaque phase.

Nous avons voulu pousser plus loin l'analyse en calculant l'énergie d'activation apparente de chaque phase de l'induction de fluorescence. C'est à cette étape que la cuvette thermoajustable est entrée en jeu. En effet, en faisant varier la température, on peut tracer un graphique de la variation du logarithme des constantes de vitesse en fonction de l'inverse de la température et la pente de ce graphique nous donne accès à l'énergie d'activation apparente de chaque phase.

Finalement, afin de tester notre nouvelle méthode d'analyse quantitative, nous avons sélectionné deux produits, le diuron (DCMU) et le décyplastoquinone (dPQ). Notre choix s'est arrêté sur ces produits car leurs effets sont bien documentés dans la littérature : il sera donc aisé de vérifier si les résultats de l'analyse quantitative collent avec la théorie.

La méthode s'est avérée une bonne façon de décomposer les courbes d'induction de fluorescence afin d'en faire une analyse quantitative. En effet, nous pouvons obtenir une excellente reconstitution des courbes à partir des paramètres d'amplitude et de temps de demi-vie trouvés pour chacune des phases. Les résultats d'énergie d'activation sont également très intéressants. Ces trois paramètres quantitatifs nous ont permis, avec une bonne certitude, d'identifier l'origine de deux des trois phases de l'induction de fluorescence. Effectivement, la phase O-J semble dépendre de la quantité réduite de l'accepteur primaire (Q_A) du photosystème II et I-P de l'état redox du bassin de plastoquinones. Nous avons également obtenu des indices sur l'origine de J-I, particulièrement l'apparente interdépendance de l'amplitude des phases O-J et J-I : si

l'amplitude de O-J diminue, celle de J-I augmente et vice-versa. Ces données ne sont cependant pas suffisantes pour permettre de déterminer l'origine de J-I.

Pour le futur, nous prévoyons moderniser la cuvette afin de la rendre plus facile à opérer. Par la suite, nous prévoyons faire des expériences avec d'autres produits comme par exemple des découpleurs de gradient de protons et électriques, des donneurs artificiels d'électrons et avec des membranes enrichies en photosystème II.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
RÉSUMÉ DU PROJET	iv
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xv
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Fonctionnement de la photosynthèse	1
1.3 Localisation des systèmes photosynthétiques	2
1.4 Les photosystèmes	3
1.4.1 Absorption lumineuse	4
1.4.2 Séparation de charges.....	4
1.5 Les complexes protéiques du PSII.....	6
1.5.1 Les divisions du PSII	7
1.5.2 Photo-oxydation et côté accepteur d'électrons	7
1.5.3 Le côté donneur d'électrons	7
1.5.4 Vitesse des réactions du PSII.....	9
1.6 Le cytochrome b_6f et les plastocyanines.....	10
1.7 La création du gradient de proton	11

1.8 Les complexes protéiques du PSI	11
1.8.1 Transport d'électron du PSI	11
1.9 Fixation du carbone.....	13
1.10 La fluorescence	14
1.11 Fluorescence chlorophyllienne.....	16
1.11.1 La fluorescence des photosystème I et II	16
1.12 L'induction de fluorescence.....	16
1.12.1 Définition de la terminologie	17
1.12.2 Atténuation de fluorescence.....	19
1.13 Utilisation de l'induction de fluorescence.....	20
1.14 Description des phases de la courbe d'induction de fluorescence	21
1.15 L'analyse des courbes	21
1.16 L'origine des phases.....	22
1.17 Les modèles théoriques.....	24
1.18 Les modèles par décomposition de courbes.....	25
1.18.1 Paramètres utilisables des analyses par décomposition de courbes	26
1.18.2 Énergie d'activation	26
1.19 Objectifs du projet.....	28
 CHAPITRE II PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES	30
2.1 Préparations des membranes thylacoïdiennes.....	30
2.2 Évaluation du contenu en chlorophylle.....	30
2.3 Description de la cuvette utilisée en induction de fluorescence	30
2.4 Préparation des échantillons pour les mesures d'induction de fluorescence.....	31
2.5 Analyses des données.....	32

CHAPITRE III QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE EXPERIMENTAL O-J-I-P CHLOROPHYLL FLUORESCENCE INDUCTION KINETICS : APPARENT ACTIVATION ENERGY AND ORIGIN OF EACH KINETIC STEP	34
3.1 Résumé.....	35
3.2 Abstract	37
3.3 Introduction.....	37
3.4 Materials and methods	39
3.4.1 Thylakoid membranes preparation.....	39
3.4.2 Sample preparation for fluorescence induction measurements.....	40
3.4.3 Data analysis	40
3.5 Results	41
3.6 Discussion	44
3.7 Acknowledgements.....	49
3.8 References.....	49
3.9 Figure and table.....	55
 CHAPITRE IV DISCUSSION GÉNÉRALE	61
4.1 Analyse des performances et des améliorations apportées à la cuvette	61
4.2 Justification des paramètres expérimentaux.....	65
4.3 Analyse qualitative des résultats	66
4.4 Analyse des simulations des courbes d'induction de fluorescence.....	69
4.5 Analyse quantitative : amplitude et temps de demi-vie des phases	71
4.6 Détermination des énergies d'activation apparentes.....	75
 CHAPITRE V CONCLUSIONS	78
5.1 Conclusions sur la validité de la méthode.....	78
5.2 Révision des différentes hypothèses sur l'origine des phases J-I et I-P.....	79
5.3 Conclusion sur l'origine des phases.....	80

5.4 Perspectives d'avenir	81
BIBLIOGRAPHIE.....	84

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Représentation schématique localisant les chloroplastes dans une feuille. On peut également apercevoir l'organisation des empilements de membranes thylacoïdiennes dans le chloroplaste	3
Figure 1.2	Graphique représentant l'efficacité de l'absorption de la lumière et de la photochimie à différentes longueurs d'onde pour certains pigments photosynthétiques.	5
Figure 1.3	Représentation schématique de la propagation de l'exciton dans les antennes jusqu'à la paire de chlorophylles photooxydables.	5
Figure 1.4	Représentation schématique du centre réactionnel du PSII. Les flèches représentent le trajet d'un électron dans la suite de réaction d'oxydoréduction du PSII. (Gracieuseté de David Joly).....	6
Figure 1.5	Représentation schématique simplifiée des réactions du complexe de manganèse du CEO ainsi que les différents état S impliqués. Les temps des différentes transitions des états S sont également indiqués.....	8
Figure 1.6	Représentation schématique simplifiée de la suite de réactions du PSII ainsi que leurs vitesses associées. (Gracieuseté de Alain Gauthier).....	9
Figure 1.7	Représentation schématique des réactions impliquant le cytochrome b_6f . Les réactions du transfert d'électrons des PQ du bassin vers les PC et ultimement le PSI sont également illustrées.....	10
Figure 1.8	Représentation schématique du PSI. Les flèches indiquent le trajet de l'électron dans la suite de réactions d'oxydoréduction.	12
Figure 1.9	Schéma en Z de la suite de réaction d'oxydoréduction des photosystème I et II.	13
Figure 1.10	Représentation schématique du cycle de la fixation du dioxyde de carbone par le cycle de Calvin.....	14
Figure 1.11	Diagramme de Jablonski simplifié des événements énergétiques menant à l'émission de fluorescence. Les flèches noires représentent l'excitation, les bleues la désactivation interne des niveaux d'énergie vibrationnels et les roses, rouges et verte les trois chemins de désactivation différents, la photochimie, l'émission d'énergie non-radiative et l'émission de fluorescence.....	15

Figure 1.12	Courbe typique d'induction de fluorescence de feuilles (A) et de membranes thylacoïdiennes (B) témoin (1) ou traitées avec 120 μmol de TMPD (2). Les points d'inflexions O, J, I, et P sont indiqués de même que les paramètres F_m , F_v et F_0	18
Figure 1.13	Illustration des paramètres utilisés pour calculer la valeur de NPQ, on peut y voir entre autre F_m' et F_m	20
Figure 1.14	Représentation de courbe d'induction de fluorescence reconstituée à l'aide d'un modèle théorique (A) et obtenue expérimentalement (B) Tiré de Xin Guang Zhu <i>et al.</i> (12).....	25
Figure 2.1	Illustration de la cuvette maison utilisée pour les mesures. On peut y voir la sonde du PEA (A), le bloc de dissipation de chaleur et les ventilateurs (B), le module thermocouple (C), la source d'alimentation (D), le voltmètre servant à lire la température (E) et finalement la plaque agitatrice (F).....	31
Figure 2.2	Illustration du Plant Efficiency analyser de Hansatech. Dans cette illustration, la sonde est en mode émission/lecture et on y aperçoit une lumière rouge de forte intensité.....	32
Figure 3.1	Typical trace of experimental Chl a fluorescence rise from O to P in isolated thylakoid membranes (open circles) and its simulation (full line) by three exponential components (O-J, J-I, and I-P) added to F_0 . For details see Materials and methods.	55
Figure 3.2	Traces of relative F_v rise kinetics (A) without additives at 15°C (1) and 25°C (2) or in the presence of 1 μM DCMU at 15°C (3) and 25°C (4), or 1 μM dPQ at 15°C (5) and 25°C (6).....	56
Figure 3.3	Amplitudes and time constants of the O-J, J-I and I-P phases simulated by exponential components at 15°C (light gray bars) and 25°C (dark gray bars) for thylakoids without additives (ctrl) or in the presence of 1 μM DCMU, or 1 μM dPQ, respectively. Amplitudes of each phase (A_{O-J} , A_{J-I} , A_{I-P}) are given in percentage of F_v . Results are means + S.D. (n=4).....	57
Figure 3.4	Arrhenius plots of rate constants of O-J (A), J-I (B) and I-P (C) rise of the fluorescence transients without additives (closed circles) or in the presence of 1 μM DCMU (open circles). E_A are \pm S.D. calculated from linear regression (n=4).....	58
Figure 3.5	Arrhenius plots of rate constants of O-J (A), J-I (B) and I-P (C) rise of the fluorescence transients without additives (closed circles) or in the presence of 1 μM dPQ (open circles). E_A are \pm S.D. calculated from linear regression (n=4).....	59

- Figure 4.1 Illustration du dernier design de la cuvette maison utilisée pour les mesures. On peut y voir, le bloc de dissipation de chaleur alimenté par le bain thermostaté (A), le module informatisé (B), la source d'alimentation (C) et finalement la plaque agitatrice (D).65
- Figure 4.2 Simulation des courbes d'induction de fluorescence à l'aide de 2 composantes (rose), 3 composantes (bleu) ou 4 composantes (rouge). Le tracé original mesuré est représenté par les cercles vides. Afin de permettre l'observation des deux courbes superposés à 3 et 4 composantes, la courbe bleue a été mise en pointillé.71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1	Quantitative analysis of FI in spinach thylakoids at 21°C FI traces were fitted with three exponential rises corresponding to O-J, J-I, and I-P phases. Results are averages \pm S.D., (n = 8).....	60
Tableau 4.1	Valeur des amplitudes O-J et J-I pour différents traitements. La somme des deux amplitudes est également représentée.....	74

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BBY	Membranes enrichies en photosystème II
CEO	Complexe d'évolution d'oxygène
D ₁	Protéine de 32 kDa du centre réactionnel du photosystème II
D ₂	Protéine de 34 kDa du centre réactionnel du photosystème II
DCMU	Diuron, herbicide -3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea
dPQ	Décyplastoquinone
E _a	Énergie d'activation
F _o	Fluorescence minimale, centres ouverts
F _{max}	Fluorescence maximale, centres fermés
F _v	Fluorescence variable, F _{max} -F _o
Fd	Ferrédoxine
NADP ⁺	Nicotine-amide dinucléotide
P ₆₈₀	Chlorophylle photo-oxydable du centre réactionnel du photosystème II
P ₇₀₀	Chlorophylle photo-oxydable du centre réactionnel du photosystème I
PEA	Plant efficiency analyser, fluorimètre d'Hansatech
Pheo	Phéophytine portée par la protéine D ₁ , l'accepteur primaire d'électron du photosystème II
Pheo 2	Phéophytine portée par la protéine D ₂ , branche inactive du photosystème II
PQ	Plastoquinone
PQH ₂	Plastoquinol (plastoquinone réduite)
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q _A	Quinone acceptrice primaire du photosystème II
Q _B	Quinone acceptrice secondaire du photosystème II (site de liaison de PQs)
S ₀ -S ₄	États redox du complexe de manganèse
t _{1/2}	Temps de demi-vie
TL	Thermoluminescence
TMPD	N,N,N', N'-tetraméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine

Y_D	Donneur d'électron auxiliaire de P_{680} , résidu Tyr160 de la protéine D_2
Y_Z	Donneur d'électron régulier de P_{680} , résidu Tyr161 de la protéine D_1

CHAPITRE I

INTRODUCTION

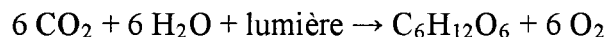
1.1 Introduction

Les organismes photosynthétiques composent la base même de la vie sur terre. (1) En effet, ce sont eux qui ont trouvé le moyen d'utiliser la plus grande source d'énergie disponible sur notre planète : l'énergie solaire. Ils convertissent cette énergie lumineuse en énergie chimique qui sera utilisée afin de synthétiser des sucres et des composés organiques complexes à partir du dioxyde de carbone contenu dans l'atmosphère terrestre. Cette faculté de fixation du CO₂, spécifique aux organismes photosynthétiques dans la biosphère terrestre fait de ces derniers la base de la chaîne alimentaire. Afin d'apprécier à quel point la photosynthèse est un processus indispensable à la vie sur terre, nous n'avons qu'à penser au fait que l'espèce humaine cultive présentement plus de 2000 variétés de plantes différentes uniquement dans le but de se nourrir et cela, sans compter les sous-espèces.

De plus, le procédé photosynthétique ne fait pas qu'éliminer le dioxyde de carbone de l'atmosphère, il produit également de l'oxygène. D'ailleurs, la vaste majorité de l'oxygène terrestre nous provient de la photolyse des molécules d'eau faite par les organismes photosynthétiques qui sont, à juste titre, considérés comme les « poumons » de notre planète.

1.2 Fonctionnement de la photosynthèse

La photosynthèse peut être résumée dans sa globalité par l'équation suivante (2):



On pourrait également dire que la photosynthèse consiste en la conversion, par un organisme, d'énergie lumineuse en énergie chimique. Cependant, bien que cette équation puisse sembler simple à première vue, les choses se complexifient rapidement

lorsque l'on tente d'élucider le fonctionnement détaillé de l'appareillage photosynthétique.

Dans l'écologie terrestre, il existe trois grandes classes d'organismes capable de réaliser la photosynthèse : les végétaux, les algues et les bactéries (3-5). Même si les mécanismes photosynthétiques généraux de ces trois classes se ressemblent, il existe tout de même des différences significatives sur certains points spécifiques. Comme le domaine d'étude de notre laboratoire est limité principalement aux plantes supérieures, tout ce dont il sera discuté dans ce travail, sauf mention explicite, se rapporte à ces dernières.

1.3 Localisation des systèmes photosynthétiques

La photosynthèse chez les plantes supérieures est réalisée dans les feuilles et plus précisément à l'intérieur d'un organe appelé chloroplaste. Les chloroplastes sont formés d'une membrane, appelée membrane externe, constituée d'une bicouche phospholipidique d'une épaisseur totale approximative de 60 Å. (6)

À l'intérieur de la membrane externe se retrouve un empilement ordonné de membranes de phospholipides appelées membranes thylacoïdiennes. Elles sont organisées en vésicules thylacoïdes (aussi appelé grana) reliées entre elles par les lamelles. (voir figure 1.1) Le tout baigne dans un fluide appelé stroma tandis que le liquide circulant à l'intérieur de l'espace clos formé par les membranes thylacoïdiennes est appelé le lumen. Le cloisonnement des membranes thylacoïdiennes est important, comme nous le verrons plus loin, pour certaines réactions photosynthétiques et pour la formation du gradient de protons. Les complexes protéiques, de même que les antennes pigmentaires des photosystèmes I et II (PSI et PSII), se retrouvent contenus dans ces membranes thylacoïdiennes.

L'abondance des PSII et PSI n'est pas constante dans toutes les régions des membranes thylacoïdiennes. En effet, les PSII se retrouvent principalement au niveau

des grana alors que les PSI se retrouvent principalement dans les marges des grana et dans les lamelles du stroma (7).

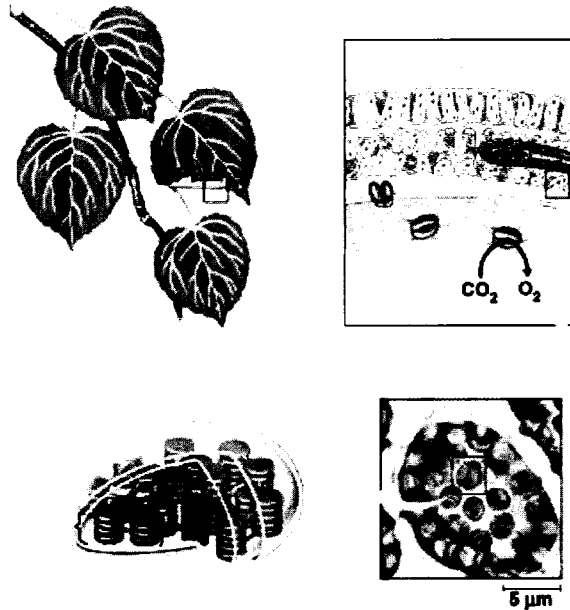


Figure 1.1 Représentation schématique localisant les chloroplastes dans une feuille. On peut également apercevoir l'organisation des empilements de membranes thylacoïdiennes dans le chloroplaste

1.4 Les photosystèmes

Il y a deux photosystèmes chez les plantes supérieures : les photosystèmes I et II, qui sont deux chaînes de transport d'électrons. Les photosystèmes sont distinguables entre eux par la longueur d'onde à laquelle ils absorbent la lumière pour effectuer leur séparation de charge respective, soit 680 nm pour le PSII comparativement à 700 nm pour le PSI. De plus, la nature précise des composants de la chaîne d'oxydoréduction qui les constituent est également différente.

En considérant que les réactions photosynthétiques sont uniquement un transport linéaire d'électrons d'une molécule d'eau à une molécule de NADP^+ , les réactions du PSII se produisent avant celles du PSI. On voit que la numérotation des photosystèmes n'est pas dans l'ordre logique des réactions. En effet, le système de numérotation est

purement historique, le PSI ayant été découvert avant le PSII. Il faut cependant noter que dans les faits, les photosystèmes sont indépendants : le PSI n'a pas nécessairement besoin du PSII pour fonctionner et vice-versa. Le transport d'électrons n'est donc pas nécessairement linéaire.

1.4.1 Absorption lumineuse

La toute première étape des réactions photosynthétiques consiste à capter de façon efficace l'énergie lumineuse. Cela est réalisé par un des complexes pigments-protéines qui forme les antennes photocollectrices de lumière des photosystèmes. Ces antennes sont composées de différentes molécules pigmentaires, entre autre les chlorophylles *a* et *b*, les caroténoïdes et les xanthophylles (8). Ces molécules confèrent aux antennes photocollectrices une capacité d'absorption de l'énergie lumineuse à des longueurs d'onde variant d'environ 400 à 700 nm, ce qui constitue une bonne partie du spectre visible (voir figure 1.2). Sans les antennes, seules les paires de chlorophylles photooxydables des photosystèmes pourraient absorber la lumière et la transformer en énergie chimique. Les antennes ajoutent des centaines de pigments autour de ces paires de chlorophylles ce qui permet d'augmenter significativement les chances de capter l'énergie lumineuse.

1.4.2 Séparation de charges

Lorsque les antennes du PSII captent de l'énergie lumineuse, elles redirigent cette énergie par transfert d'excitons vers une paire de chlorophylles spéciales localisées dans le centre réactionnel nommée P680 dans le cas du PSII et P700 dans le cas du PSI. (voir figure 1.3) La capture de l'exciton par le P680 ou le P700 est suffisante pour faire passer un électron de la chlorophylle dans une couche énergétique supérieure ; l'électron de cette chlorophylle se retrouvera donc dans un état excité (9). L'électron pourra ensuite être transféré à un accepteur proche et ainsi initier la chaîne de transport d'électrons. On dit des chlorophylles P680 et P700 qu'elles sont photooxydables.

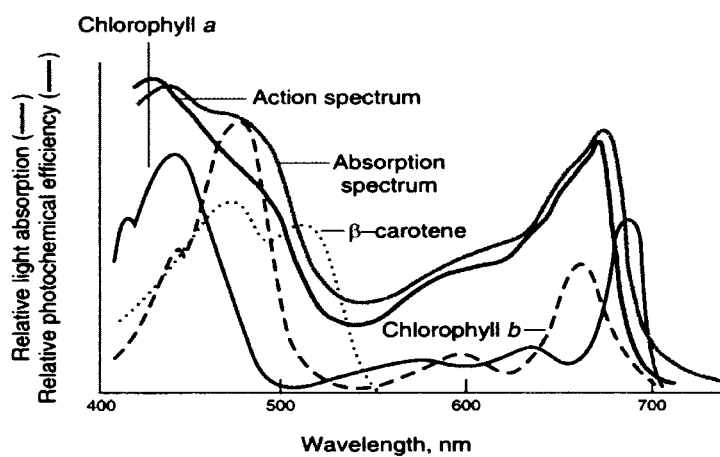


Figure 1.2 Graphique représentant l'efficacité de l'absorption de la lumière et de la photochimie à différentes longueurs d'onde pour certains pigments photosynthétiques.

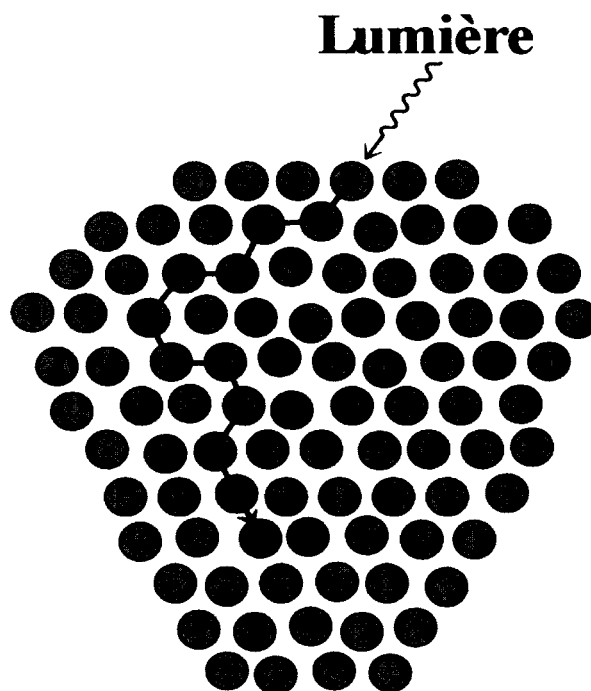


Figure 1.3 Représentation schématique de la propagation de l'exciton dans les antennes jusqu'à la paire de chlorophylles photooxydables.

1.5 Les complexes protéiques du PSII

Le photosystème II est un énorme complexe de protéines d'une masse d'environ 320 kDa. Il est composé d'environ seize sous-unités transmembranaires, de trois unités hydrophiles et d'environ 80 cofacteurs différents (10). Le centre réactionnel du PSII est quant à lui constitué principalement d'un dimère de deux polypeptides, D₁ et D₂, qui sont d'un poids moléculaire d'environ 32kDa chacun. La majorité des cofacteurs et les chromophores essentiels au transport d'électrons sont liés à l'une ou l'autre de ces deux sous-unités. (voir figure 1.4)

D'autres peptides sont également nécessaires au bon fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons. Tout d'abord les protéines CP43 et CP47 sur lesquelles sont liées les molécules de chlorophylle formant le cœur de l'antenne photocollectrice de lumière des PSII. Il y a également trois protéines extrinsèques de poids moléculaires respectifs de 17 kDa, 23 kDa et 33 kDa flanquant le CEO. Elles servent entre autres à stabiliser les ions Cl⁻ et Ca²⁺ qui sont essentiels au maintien du bon fonctionnement du CEO (10, 11).

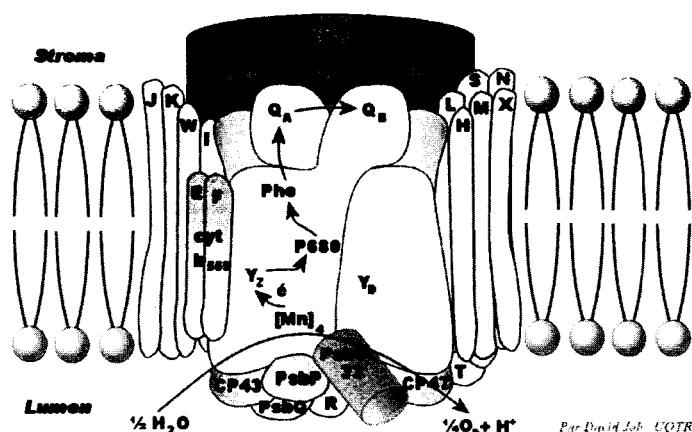


Figure 1.4 Représentation schématique du centre réactionnel du PSII. Les flèches représentent le trajet d'un électron dans la suite de réaction d'oxydoréduction du PSII. (Gracieuseté de David Joly)

1.5.1 Les divisions du PSII

Le photosystème II est généralement divisé en deux parties : le côté donneur d'électrons qui comprend le CEO, la tyrosine Z (Y_Z) et le P680 et le côté accepteur d'électrons qui comprend une phéophytine (pheo) les accepteurs quinoniques primaires et secondaires (Q_A et Q_B) et le bassin de plastoquinones (PQ). Bien qu'il ne fasse pas partie du côté accepteur d'électrons, le cytochrome b_6f et les plastocyanines (PC) sont les intermédiaires entre ce dernier et le PSI.

1.5.2 Photo-oxydation et côté accepteur d'électrons

La chaîne de réaction du PSII débute lorsque les antennes photocollectrices de lumière captent de l'énergie lumineuse et la transmettent, par transfert d'excitons, au P680. Lorsque le P680 absorbe un photon d'une longueur d'onde de 680 nm, il passe alors à sa forme excitée $P680^*$. Cet électron devient alors faiblement lié au P680 et peut alors être transféré à une molécule de phéophytine α voisine portée par la protéine D_1 , ce qui crée l'espèce $P680^+$. La chaîne de transport d'électrons se met alors en branle et la phéophytine transférera ensuite son électron à l'accepteur quinonique primaire du PSII, une plastoquinone portée par la protéine D_2 appelée Q_A . Q_A transférera à son tour l'électron à l'accepteur quinonique secondaire, une plastoquinone du bassin (PQ) situé au site Q_B qui est porté par la protéine D_1 . Cependant, avant de pouvoir être libérée du site Q_B , la plastoquinone devra accepter un second électron provenant d'une autre séparation de charge du P680. L'arrivée de ce deuxième électron sur la PQ entraîne sa protonation rapide en PQH_2 (plastoquinone réduite). Cette espèce possède une affinité pour le site Q_B grandement diminuée, par rapport à la molécule de PQ oxydée initiale, ce qui causera le relargage de PQH_2 (12, 13).

1.5.3 Le côté donneur d'électrons

Comme nous l'avons vu, chaque séparation de charge permettant d'envoyer un électron dans la chaîne de transport d'électrons du PSII génère l'espèce $P680^+$. Après chaque séparation de charge, Y_Z localisée sur la protéine D_1 va fournir un électron afin

de réduire $P680^+$ en $P680$. Y_Z^+ sera à son tour réduit par un complexe formé de quatre atomes de manganèse constituant le cœur du CEO (10).

Ce noyau de quatre manganèses est celui qui catalyse, à l'aide de certains ions, l'oxydation des molécules d'eau. Les quatre manganèses forment un cycle appelé le cycle des états S. Ces derniers sont numérotés de S_0 à S_4 , chiffres qui représentent l'état d'oxydation des manganèses. Dans des conditions normales, en omettant les recombinaisons de charges, pour chaque séparation de charge effectuée, le cycle des états S avance de 1 passant, par exemple, de S_1 à S_2 . Le cycle comporte donc cinq états différents, S_0 , S_1 , S_2 , S_3 et S_4 . Toutefois, l'état S_4 est transitoire et il se désactive très rapidement pour reformer S_0 et ce, sans avoir à réduire le $P680^+$. Pour cette raison, l'état S_4 n'est souvent pas considéré et on parlera d'un cycle à 4 membres (voir figure 1.5)

Afin de pouvoir libérer une molécule d'oxygène ainsi que quatre protons, il faut passer par tout le cycle des états S et donc transférer quatre électrons au $P680^+$ à la suite de quatre séparations de charges différentes. Comme le CEO est localisé du côté lumen de la membrane thylakoïdale, les protons libérés par le CEO vont participer à la formation du gradient de proton nécessaire à la production d'ATP (14).

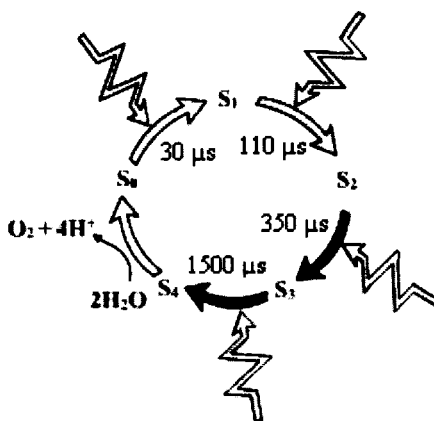


Figure 1.5 Représentation schématisée simplifiée des réactions du complexe de manganèse du CEO ainsi que les différents états S impliqués. Les temps des différentes transitions des états S sont également indiqués

1.5.4 Vitesse des réactions du PSII

Il faut noter que les réactions se produisant dans le PSII n'ont pas toutes la même vitesse, chacune possédant une constante de vitesse qui lui est propre. Ces différentes vitesses deviennent importantes lorsque l'on tente d'élucider le fonctionnement précis du mécanisme photosynthétique comme nous le verrons plus loin. Une version simplifiée de l'ensemble des réactions pour la majorité des espèces formées lors du transport d'électrons du PSII ainsi que leurs vitesses associées est donnée dans la figure 1.6 (15-17).

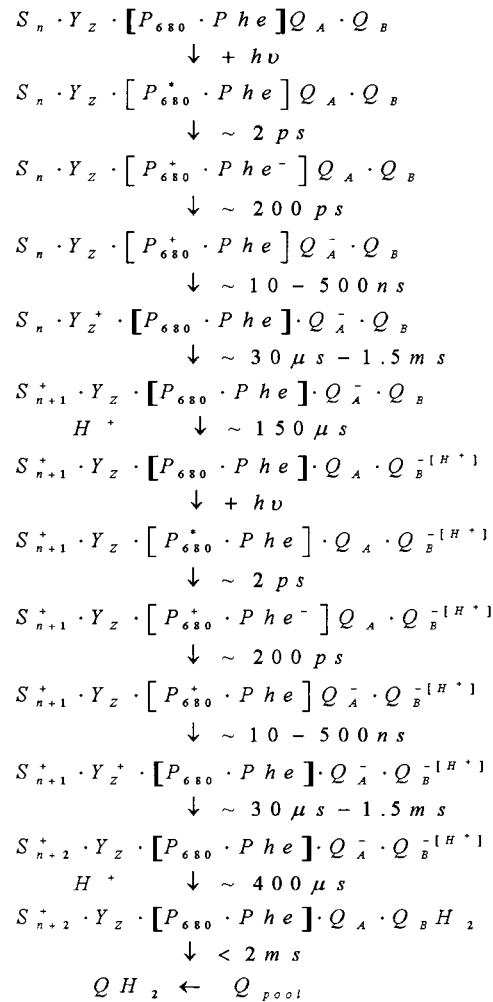
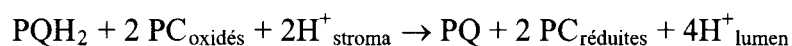


Figure 1.6 Représentation schématique simplifiée de la suite de réactions du PSII ainsi que leurs vitesses associées. (Gracieuseté de Alain Gauthier)

1.6 Le cytochrome b_6f et les plastocyanines

Le cytochrome b_6f , aussi connu sous le nom de plastiquinol/plastocyanine réductase, est une structure protéique d'environ 210 kDa qui est constituée de trois polypeptides principaux: le cytochrome f , le cytochrome b_6 et une protéine fer-souffre Rieske. Le cytochrome b_6f catalyse le transfert des électrons entre les molécules de PQH_2 et molécules de PC. Cette réaction contribue également à la formation du gradient de protons en transférant des protons du stroma vers le lumen. Les réactions du cytochrome b_6f peuvent se résumer par l'équation suivante :



Les PC réduites ainsi formées pourront ensuite fournir les électrons nécessaires à la réduction de $P700^+$ en $P700$ (18). (voir figure 1.7)

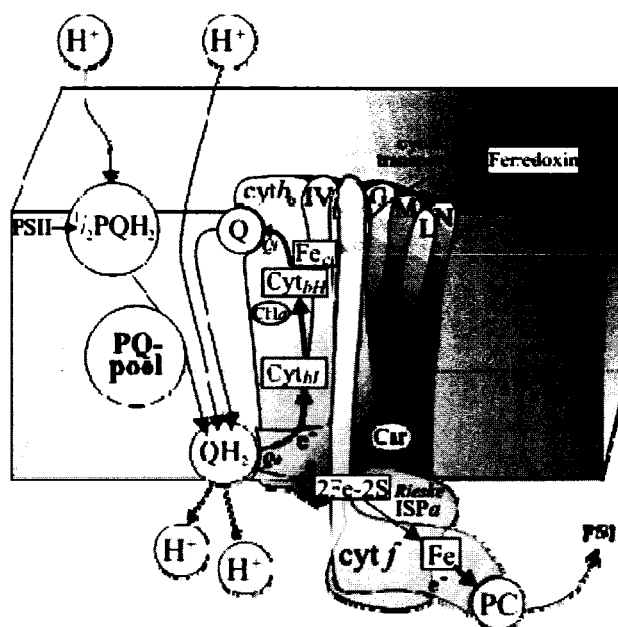


Figure 1.7 Représentation schématique des réactions impliquant le cytochrome b_6f . Les réactions du transfert d'électrons des PQ du bassin vers les PC et ultimement le PSI sont également illustrées

1.7 La création du gradient de proton

Comme nous l'avons vu, plusieurs réactions des systèmes photosynthétiques contribuent à acidifier le lumen des membranes thylacoïdiennes. On peut penser entre autres aux réactions du CEO qui vont libérer quatre protons dans le lumen par cycle complet des états S, à la réduction du bassin de PQ, qui puise deux protons du stroma et aux réactions du cytochrome b_6f qui libèrent deux protons dans le lumen. L'énergie emmagasinée dans le gradient de proton pourra ensuite être utilisée par une protéine membranaire, l'ATP synthase, afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP). L'ATP ainsi produit pourra ensuite être utilisé comme source d'énergie pour les réactions du cycle de Calvin servant à la production de sucre (19).

1.8 Les complexes protéiques du PSI

Le PSI est constitué d'un hétéro-dimère protéique dont les deux polypeptides ont une masse de 83 kDa. Comme dans le cas des PSII, la majorité des cofacteurs ou chromophores essentiels au transport des électrons sont liés à l'une ou l'autre de ces deux sous-unités (20).

1.8.1 Transport d'électron du PSI

Le PSI assure le transfert des électrons des PC, donc en provenance du PSII, à la ferrédoxine et ultimement au NADPH. La chaîne de transport d'électrons utilise tout d'abord comme accepteur primaire une chlorophylle (A_0) qui pourra ensuite transférer son électron à une plastoquinone (A_1). Ensuite, deux protéines fer-souffre (F_A/F_B et F_X) se succéderont dans la cascade de réactions pour finalement aboutir à la ferrédoxine (Fd). Lorsque la Fd aura capté deux électrons, elle pourra réduire la molécule de $NADP^+$ en NADPH (21). (voir figure 1.8)

Toutefois, le PSI peut aussi être son propre donneur d'électrons en effectuant un transport cyclique des électrons plutôt qu'un transport linéaire. En effet le PSI peut, via le cytochrome b_6f , transférer les électrons de la Fd au bassin de PQ. Lorsque le PSI fonctionne en mode cyclique, il ne pourra pas réduire une molécule de $NADP^+$ en

NADPH mais il participera à la création du gradient de proton via les réactions de cytochrome b_6f , comme nous l'avons vu dans la section 1.7. Le transport cyclique des électrons sert entre autres à balancer et optimiser le ratio ATP/NADPH produit par la chaîne de transport photosynthétique (22).

Toutes les cascades d'événements, pour le transport linéaire d'électrons, des PSII et PSI sont représentées par un schéma réactionnel connu sous le pseudonyme de cascade en Z comme montré sur la figure 1.9. On notera que la séparation de charge crée des espèces chimiques de haute énergie comme par exemple le $P680^*$. Plus on avance dans le schéma réactionnel, plus l'énergie des différentes espèces impliquées diminue, ce qui constitue le moteur de la réaction.

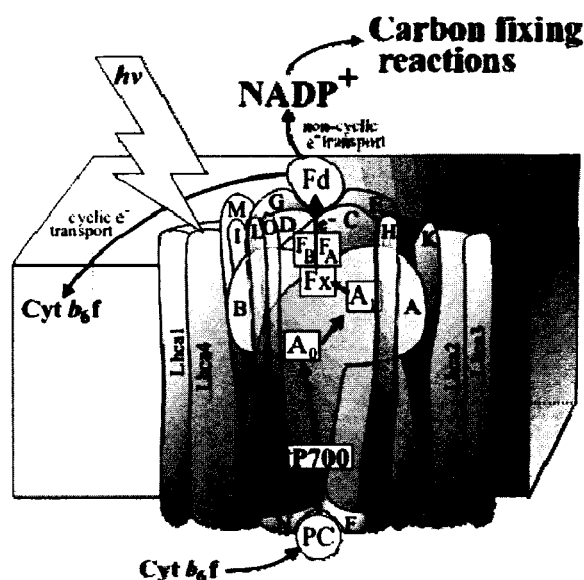


Figure 1.8 Représentation schématique du PSI. Les flèches indiquent le trajet de l'électron dans la suite de réactions d'oxydoréduction.

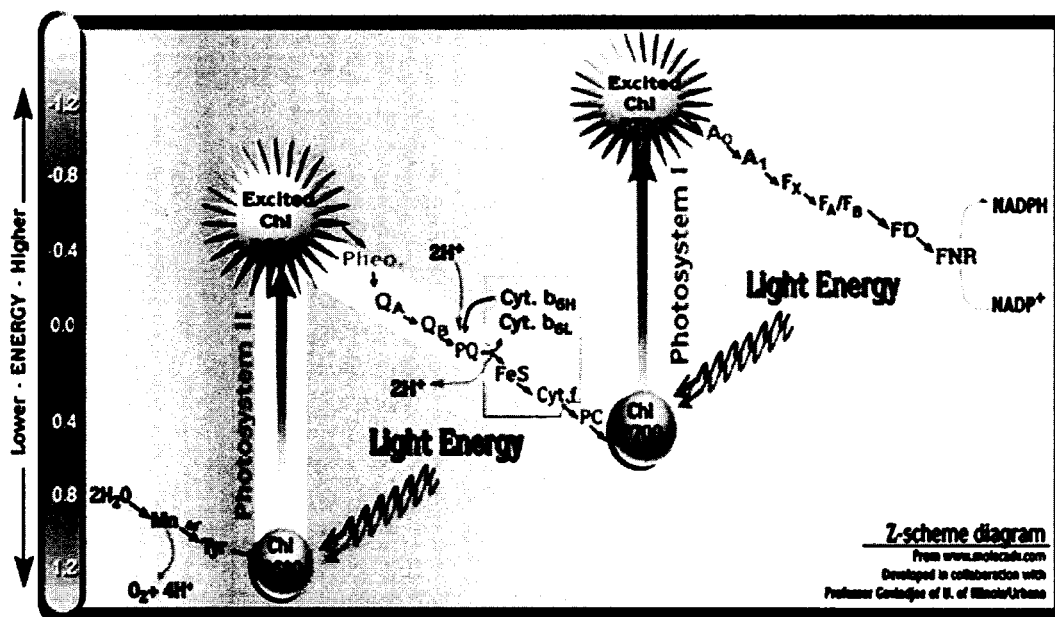


Figure 1.9 Schéma en Z de la suite de réaction d'oxydoréduction des photosystème I et II.

1.9 Fixation du carbone

La fixation du carbone, également nommée le cycle de Calvin, utilise l'énergie chimique (ATP et NADPH) produite par les réactions lumineuses pour fixer du dioxyde de carbone à une molécule de ribulose-1,5-biphosphate. Cette réaction se passe dans le stroma et est catalysée par l'enzyme Rubisco, l'enzyme la plus abondante sur Terre (23). Le produit final de la réaction est une molécule d'acide phosphoglycérique qui pourra ensuite être transformée en sucres plus complexes comme le glucose. Il en coûte trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH pour fixer une molécule de dioxyde de carbone. (voir figure 1.10)

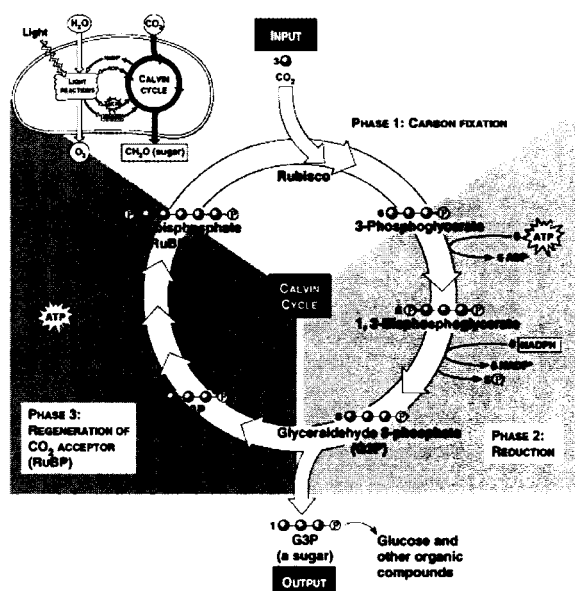


Figure 1.10 Représentation schématique du cycle de la fixation du dioxyde de carbone par le cycle de Calvin

1.10 La fluorescence

Lorsqu'une molécule absorbe une onde électromagnétique, il est possible, pour revenir à son état fondamental d'énergie, que cette molécule émette un photon. On parle alors soit du phénomène de fluorescence, si cette émission se produit dans l'ordre des nanosecondes, soit du phénomène de phosphorescence, si l'émission se produit dans des ordres de grandeurs plus importants. La figure 1.11 illustre le phénomène ; il faut tout d'abord une excitation par une onde électromagnétique illustrée en noir afin d'amener la molécule à un état d'énergie « S » supérieur (ne pas confondre avec les états S du CEO). Ensuite, une étape extrêmement rapide (de 10^{-14} à 10^{-11} secondes environ) de désactivation interne des niveaux d'énergie vibrationnels représentée par les flèches en bleu peut se produire. Finalement, pour revenir à l'état de base (ground state), il peut y avoir plusieurs phénomènes distincts qui entrent en compétition : la fluorescence, la désactivation non radiative ou dans le cas spécifique des photosystèmes, la photochimie (24).

La plupart des molécules ne sont pas fluorescentes, car la fluorescence demande des caractéristiques structurales particulières, favorisant la désactivation par fluorescence plutôt que par relaxation non radiative. La relaxation est en effet généralement plus rapide que l'émission de fluorescence et donc la molécule préconisera d'avantage ce mode de désactivation.

Les caractéristiques de fluorescence, telles la longueur d'onde d'absorption électromagnétique et celle de l'émission du photon, sont relativement spécifiques à chaque espèce étudiée. Par exemple, pour les atomes de sodium gazeux, la longueur d'onde d'absorption est de 330 nm et celle d'émission est également de 330 nm. On notera aussi que la longueur d'onde d'émission est habituellement plus longue (ou égale) à la longueur d'onde d'absorption, donc de plus faible énergie (24).

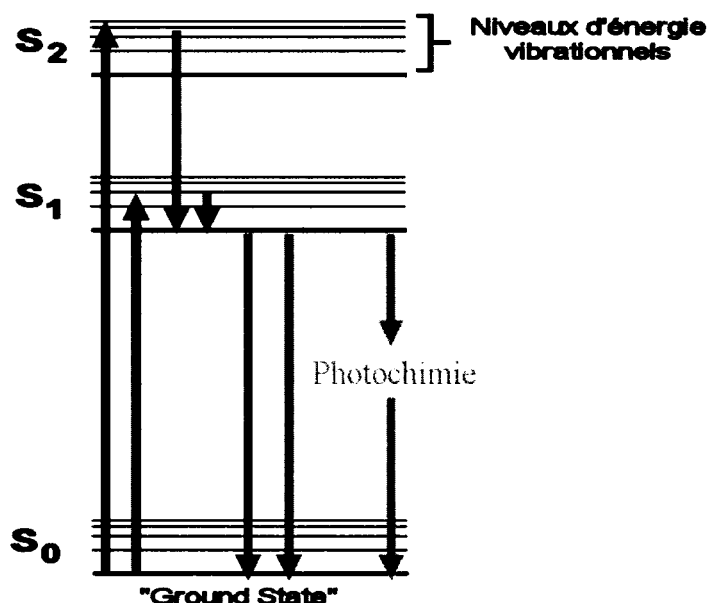


Figure 1.11 Diagramme de Jablonski simplifié des événements énergétiques menant à l'émission de fluorescence. Les flèches noires représentent l'excitation, les bleues la désactivation interne des niveaux d'énergie vibrationnels et les roses, rouges et verte les trois chemins de désactivation différents, la photochimie, l'émission d'énergie non-radiative et l'émission de fluorescence

1.11 Fluorescence chlorophyllienne

Dans le cas des systèmes photosynthétiques, ce sont les chlorophylles qui fournissent le signal de fluorescence. Ce sont donc les antennes, constituées de centaines de chlorophylles, qui vont émettre la majeure partie du signal de fluorescence (25).

Lorsque l'énergie lumineuse est captée par l'antenne photocollectrice de lumière, l'énergie peut être dissipée de trois façons : par réaction photochimique, par fluorescence ou encore par émission non-radiative (principalement la chaleur). Nous pouvons donc utiliser l'équation suivante :

$$1 = E_{\text{Photochimique}} + E_{\text{Non radiative}} + E_{\text{Fluorescence}}$$

où $E_{\text{Photochimique}}$ représente la fraction de l'énergie reçue utilisée pour la photochimie, $E_{\text{Non radiative}}$ la fraction dissipée sous forme d'émission de chaleur et $E_{\text{Fluorescence}}$ la fraction dissipée sous forme d'émission de fluorescence (12, 26). On observe donc noter qu'une augmentation de la photochimie va généralement entraîner une diminution de la fluorescence et vice-versa. La fluorescence est donc une excellente sonde afin de déterminer la fonctionnalité des photosystèmes (27).

1.11.1 La fluorescence des photosystème I et II

Comme la fluorescence chlorophyllienne provient des antennes, on peut aisément comprendre qu'à la fois les antennes PSII et les PSI vont émettre de la fluorescence, ce qui complique la tâche pour l'analyse spécifique. Toutefois, à la température de la pièce, et aux longueurs d'onde utiliser par notre appareillage (655 nm), la contribution du PSI à la fluorescence totale des photosystèmes est habituellement d'au plus 20% (28). Cependant, pour certaines plantes, si on mesure l'induction de fluorescence à 700 nm, la contribution du PSI à l'intensité totale du signal peut aller jusqu'à 50% (29).

1.12 L'induction de fluorescence

L'induction de fluorescence est définie comme une mesure de la fluorescence en fonction du temps et fut découverte par Kautsky et Hirsch en 1931 (30). Cette technique

est maintenant très utilisée pour sonder l'état de la chaîne de transport d'électrons du PSII car l'induction de fluorescence est spécifique au PSII parce que le signal en provenance du PSI est souvent ignoré lors de mesures d'induction de fluorescence. En effet, une caractéristique essentielle de l'induction de fluorescence est la variabilité du signal en fonction du temps ; on étudie donc une cinétique. (voir figure 1.12) Or, des expériences ont démontré que la fluorescence du PSI n'est pas variable, donc elle est une constante tout au long de l'expérience et on peut donc conclure que la variabilité du signal de fluorescence provient uniquement du PSII (27, 31, 32).

Si nous étudions la question plus en détail, on verra que la raison de la variabilité du signal en induction de fluorescence du PSII est due au fait que le rendement de l'induction de fluorescence dépend principalement de l'état redox de l'accepteur primaire Q_A (33). Lorsque Q_A est oxydé, donc s'il peut accepter un électron, le rendement est minimal tandis qu'il atteint une valeur maximale lorsque Q_A est réduit. L'état redox du bassin de PQ aurait également un effet sur le signal d'induction de fluorescence : un bassin de PQ oxydé diminuant l'intensité du signal d'induction de fluorescence (26).

Il est aisé de comprendre pourquoi Q_A et PQ, lorsqu'ils sont oxydés, diminuent le rendement de fluorescence. En effet, on se souviendra que si les réactions photochimiques peuvent avoir lieu, donc si Q_A et PQ peuvent accepter des électrons, on observera le phénomène de photochimie au détriment de la fluorescence (12).

1.12.1 Définition de la terminologie

Il devient nécessaire de définir certains termes utilisés lors de l'analyse de l'induction de fluorescence. La fluorescence initiale, F_0 , est définie comme étant la fluorescence avant que l'excitation transmise par les antennes photocollectrices atteigne le centre réactionnel, donc quand la majorité des centres réactionnels sont ouverts (ou en capacité d'accepter un électron). La fluorescence maximale, F_m , est définie comme étant la fluorescence au point maximal lorsque la majorité des centres réactionnels sont fermés (ou qu'ils n'ont pas la capacité d'accepter un électron). La majorité des auteurs

s'entendent pour dire que F_m est atteint lorsque la réduction du bassin de PQ est complète (dans le cas d'un témoin) (12, 34).

Une autre notion importante est le rendement quantique de la photochimie, présenté comme étant le rapport $(F_m - F_0) / F_m$ ou encore le ratio F_v/F_m où F_v représente la fluorescence variable. Le ratio F_v/F_m est beaucoup utilisé afin d'estimer le rendement photosynthétique. En effet, plus ce ratio est élevé, meilleur est le rendement photochimique. (voir figure 1.12) L'efficacité photosynthétique est habituellement très élevée et dans des conditions optimales le ratio F_v/F_m est d'environ 0,84 (34, 35).

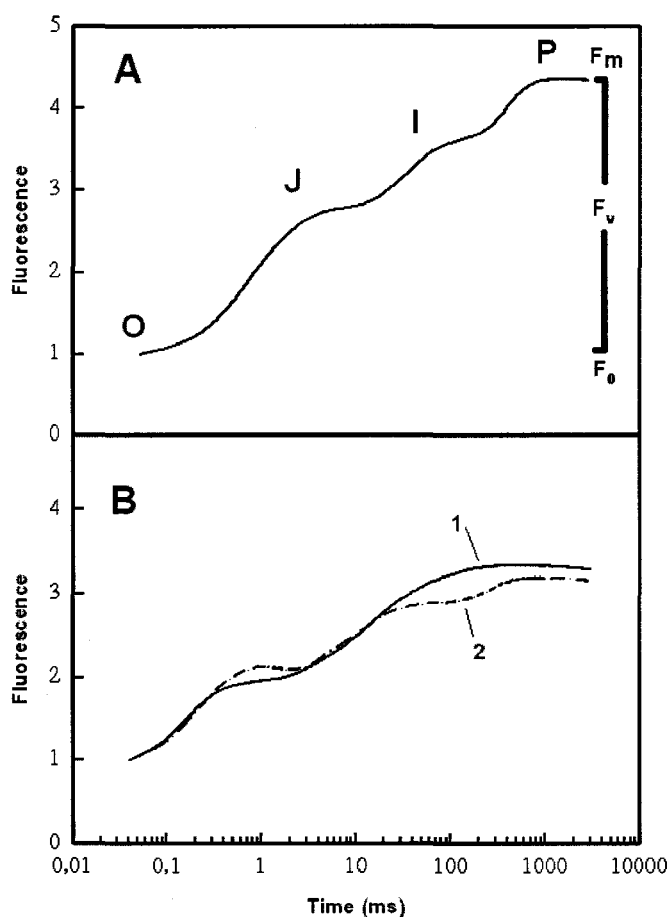


Figure 1.12 Courbe typique d'induction de fluorescence de feuilles (A) et de membranes thylacoïdiennes (B) témoin (1) ou traitées avec 120 μmol de TMPD (2). Les points d'inflexions O, J, I, et P sont indiqués de même que les paramètres F_m , F_v et F_0

1.12.2 Atténuation de fluorescence

L'atténuation de fluorescence se définit comme un processus qui cause une diminution du signal de fluorescence. Dans le cas de l'induction de fluorescence, il y a deux types d'atténuation : photochimique et non photochimique. Un exemple d'atténuation photochimique est lorsque Q_A ne porte aucune charge, ce qui implique donc qu'il peut accepter un électron. Puisque Q_A peut réaliser des réactions photochimiques, contrairement à l'espèce Q_A^- , la chance que l'énergie reçue soit retransmise sous forme de fluorescence est diminuée. L'espèce Q_A est donc considérée comme un atténuateur photochimique de la fluorescence (31, 36, 37).

Par contre, certaines molécules désactivent les excitations directement dans les antennes photocollectrices de lumière. Par le fait même, on notera une diminution de la fluorescence observée lorsque ces molécules seront présentes car une partie des excitons n'atteindra jamais le centre réactionnel. Ce type d'atténuation est utilisé par les PQ oxydés qui sont donc des atténuateurs non photochimiques du signal de fluorescence (13, 38, 39).

On peut également définir mathématiquement les différentes atténuations. Par exemple l'atténuation photochimique (q_P) se définit comme :

$$q_P = (F_m - F) / (F_m - F_0)$$

Où F_m et F_0 sont les niveaux maximal et minimal de fluorescence et F le niveau de fluorescence à un moment défini dans la courbe d'induction de fluorescence. On peut également faire de même pour définir mathématiquement l'atténuation non photochimique (NPQ) (27, 31, 40) :

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

Où F_m est le niveau maximal de fluorescence lorsque l'échantillon est adapté dans le noir et F_m' est la fluorescence maximale suite à une exposition à la lumière. (Voir figure 1.13)

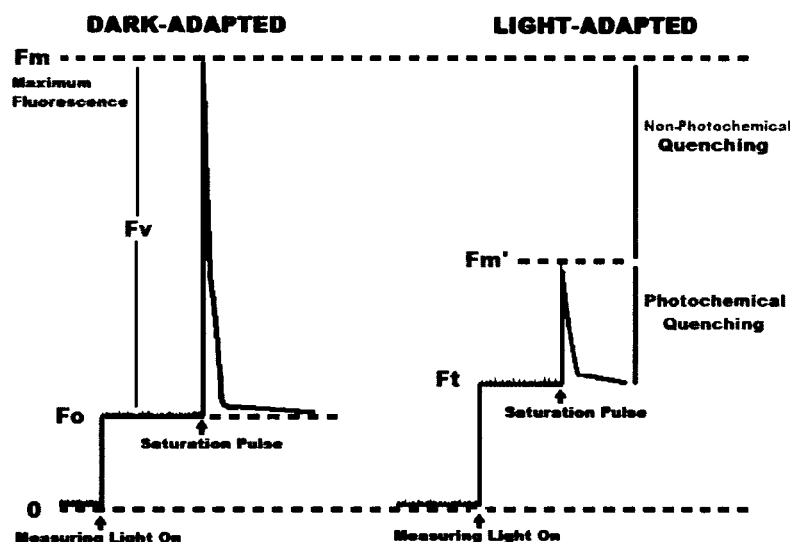


Figure 1.13 Illustration des paramètres utilisés pour calculer la valeur de NPQ, on peut y voir entre autre F_m' et F_m

1.13 Utilisation de l'induction de fluorescence

L'induction de fluorescence du PSII est présentement utilisée dans la majorité des laboratoires travaillant en photosynthèse. C'est en effet une méthode de choix pour plusieurs raisons. Premièrement, les mesures sont non-invasives, ce qui veut dire que l'on peut répéter les mesures plusieurs fois à condition de laisser l'échantillon se réadapter dans le noir. Deuxièmement, les fluorimètres sont des appareils fiables et relativement peu coûteux, spécialement les modèles possédant des longueurs d'ondes de travail prédéterminées qui n'ont pas de pièces mobiles. De plus, certains appareils récents sont maintenant aisément transportables, les plus petits pouvant tenir dans la main et ils permettent de faire des mesures directement sur le terrain. Finalement, les lectures de données sont également très rapide et aisées à faire, l'appareil faisant bien souvent la majorité des calculs de F_0 , F_m et F_v/F_m automatiquement (27, 41).

Les possibilités de l'induction de fluorescence sont grandes ; elle permet entre autres de vérifier l'effet de divers polluants, d'herbicides et de divers traitements, que ce soit directement dans une feuille ou dans une isolation de matériel photosynthétique. Elle peut également être utilisée pour vérifier l'effet d'un produit tout au long de la croissance d'une plante en mesurant l'induction de fluorescence d'une même feuille durant plusieurs semaines (42).

1.14 Description des phases de la courbe d'induction de fluorescence

Des courbes d'induction de fluorescence typiques d'une feuille et des membranes thylacoïdiennes sont présentées dans la figure 1.12. On notera que l'échantillon est traité avec du *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*p*-phénylènediamine (TMPD) afin de permettre la séparation des phases O-J et J-I. (43) Cette courbe est multiphasique et on la présente généralement en échelle logarithmique. C'est donc dire qu'elle comporte plusieurs inflexions délimitées entre elles par des points maximaux, O, J, I et P. Ces lettres proviennent d'une nomenclature simple, O pour *origin*, I pour *inflexion* et P pour *peak*. Le point d'inflexion J fut découvert par la suite et on lui attribua cette lettre arbitrairement (27).

Chacun de ces points d'inflexion peut être regroupé afin de former 3 phases distinctes dans les courbes d'induction de fluorescence : les phases O-J, J-I et I-P. Ces phases semblent être reliées aux équilibres redox des accepteurs primaires (Q_A) et secondaires (Q_B) de même que du bassin de PQ (27).

1.15 L'analyse des courbes

Bien que la méthode d'induction de fluorescence soit vieille de plus de 70 ans et qu'elle soit utilisée à grande échelle, il reste plusieurs mystères, entre autre l'origine des phases O-J-I-P. (32, 44) Présentement, la plupart des auteurs analysant des courbes d'induction de fluorescence utilisent seulement les paramètres F_v/F_m , F_0 et F_m et ils font une analyse visuelle sommaire des variations majeures des phases O-J-I-P par une analyse de type qualitative (45). Si ce type d'observation permet de déceler les changements majeurs dans les courbes d'induction de fluorescence, on ne peut voir les

changements plus subtils mais qui auraient néanmoins un effet significatif sur l'interprétation des courbes. De plus, comme on ne connaît pas la signification exacte des phases, il est difficile de conclure sur le site d'action de différents composés.

1.16 L'origine des phases

Si la majorité des auteurs dans la littérature s'entendent pour dire que l'origine des phases O-J-I-P provient de l'évolution de l'état d'oxydoréduction de l'appareil photosynthétique du PSII, les choses se compliquent en ce qui concerne l'attribution de l'origine de chaque phase à une réaction du PSII en particulier (27, 44, 46).

En ce qui concerne l'origine de O-J, la majorité des auteurs sont en accord pour dire qu'il s'agit de l'accumulation de l'accepteur quinonique primaire Q_A sous sa forme réduite Q_A^- . (34, 36) Il faut cependant noter que la littérature récente a plus tendance à voir l'origine de O-J comme étant représentée par un équilibre dans la formation de l'espèce Q_A^- plutôt que dans son accumulation à proprement parler. Cette différence d'interprétation dans l'origine de la phase O-J peut sembler mineure, mais elle est importante à la lumière des plus récentes découvertes quant au temps nécessaire à l'accumulation maximale de Q_A^- . En effet, des études ont démontré que l'espèce Q_A^- atteint son accumulation maximale très rapidement lors de l'induction de fluorescence, avant même l'atteinte du point d'inflexion J. Par contre, il fut démontré que les équilibres impliquant Q_A^- (entre autre les équilibres avec Q_B , Q_B^- et Q_B^{2-}) se déroulent dans le même ordre de temps que la phase O-J. (ainsi que J-I) (13).

La situation se complique toutefois lorsque l'on examine la phase J-I. Tout d'abord, il faut clarifier le point de la présence de la phase J-I dans les isolations de membranes thylacoïdiennes. En effet, certains auteurs prétendent que J-I n'est présente que dans les feuilles. Effectivement, des études avec un accepteur d'électrons artificiel, ont permis pour la première fois une séparation claire des phases O-J et J-I, induites par le retard dans la montée I-P, dans les isolations des membranes thylacoïdiennes. Il est possible que la seule raison pour laquelle on ne peut observer le point d'inflexion I dans les tracés d'induction de fluorescence soit que les deux phases sont superposées (46).

Toutefois, nous montrerons plus loin que la composante J-I, bien que difficile à déceler visuellement, représente 35% (tableau 3.1) de l'amplitude totale des courbes d'induction de fluorescence des membranes thylacoïdiennes. Ce point étant maintenant clarifié, nous allons exposer les différentes théories courantes sur l'origine de la phase J-I. (voir figure 1.12)

Il existe plusieurs hypothèses concernant l'origine de la phase J-I dont quatre principales. La première voit J-I comme résultant d'un effet du côté donneur (CEO ou Y_Z) qui aurait pour effet de réguler la quantité d'électron donné au $P680^+$ et ainsi de moduler les proportions réduits/oxydés de la population des accepteurs primaires et secondaires (40).

La seconde théorie propose un transport alternatif d'électrons autour du PSII qui pourrait être à l'origine de la phase J-I. Ce transport impliquerait la branche inactive du PSII. En effet, on se rappellera que le centre réactionnel des PSII est constitué d'un hétérodimère. Cela implique donc qu'il y a une deuxième tyrosine (Y_D) et une deuxième phéophytine (pheo 2) qui ne sont pas utilisées dans la chaîne d'oxydoréduction des PSII. Schreiber a proposé que cette branche inactive pourrait être en mesure d'accepter des électrons lorsque Q_A est déjà réduit. Cependant la branche inactive du transport d'électrons ne peut pas se poursuivre au delà de pheo 2 : la charge portée par cette dernière va se recombinaison plutôt que d'être transférée à une PQ du bassin situé au site Q_B (44, 47).

La troisième hypothèse serait que la formation d'un gradient électrique, dû en majeure partie au gradient de protons formé au fur et à la mesure de l'avancement de l'induction de fluorescence, pourrait venir interférer avec le transport d'électrons dans la membrane. Comme ce transport d'électrons (donc de charges négatives) est polarisé dans la membrane, une accumulation de charge positive (protons) dans le lumen pourrait affecter la vitesse des transferts d'électrons (48, 49).

Finalement, la quatrième théorie implique deux bassins de PQ, un rapide situé dans le grana et un lent situé dans le stroma. Le bassin rapide représenterait une partie des PQ pouvant se lier très rapidement au site Q_B afin d'y être réduite. Cette population de PQ serait à l'origine de la phase J-I alors que le bassin lent serait quant à lui à l'origine de la phase I-P (50, 51).

Pour la phase I-P, deux théories principales subsistent. Premièrement, comme dans le cas de J-I, la phase I-P pourrait être due à un changement de potentiel transmembranaire dû au gradient de protons (48, 49). L'autre théorie serait que la phase I-P est due à la réduction du bassin de PQ (13, 27). Il est à noter que cette dernière hypothèse n'oblige pas nécessairement d'avoir un bassin rapide et un bassin lent. Autrement dit, si on conclut que I-P est reliée au bassin de PQ, cela n'implique pas obligatoirement que J-I l'est également.

Afin d'améliorer l'analyse des courbes d'induction de fluorescence, de même que pour aider à clarifier l'origine des différentes phases, certains auteurs se sont appliqués à développer de nouveaux modèles de l'induction de fluorescence. Il y a deux façons d'aborder le problème : tenter, à partir de modèles théoriques, de reconstituer une courbe d'induction de fluorescence et à l'inverse ceux qui partent de la courbe d'induction de fluorescence pour tenter d'approximer sa forme par un modèle de décomposition.

1.17 Les modèles théoriques

De plus en plus de réactions biochimiques et photochimiques des photosystèmes, de même que leur constante de vitesse, sont maintenant connues et il est donc naturel que certains auteurs tentent, à partir de la théorie, de reconstituer ce qui est observé au laboratoire. Tous les problèmes concernant l'origine des phases seraient résolus si on pouvait reconstituer la courbe d'induction de fluorescence à partir de l'addition dans un modèle de toutes les réactions d'oxydoréduction des photosystèmes. Cependant, comme les PSI et PSII sont d'énormes chaînes enzymatiques comportant une myriade de réactions chimiques, qui sont parfois interconnectées, on comprendra que les modèles se complexifient rapidement. Les auteurs de ces modèles théoriques présentent souvent des

pages complètes de constantes de vitesses afin de construire leurs modèles (12, 13). Jusqu'à ce jour, aucun modèle théorique n'est capable de bien simuler les courbes d'induction de fluorescence observées au laboratoire, bien que certains s'en approchent beaucoup dans certains cas spécifiques comme dans la figure 1.14. On peut cependant extraire des informations intéressantes de l'analyse de ces modèles théoriques. Par exemple prédire l'état redox à un temps défini de la courbe d'induction de fluorescence des accepteurs primaire et secondaire d'électrons ou encore voir l'effet théorique de certains composés (du bassin de PQ par exemple) sur l'induction de fluorescence (13).

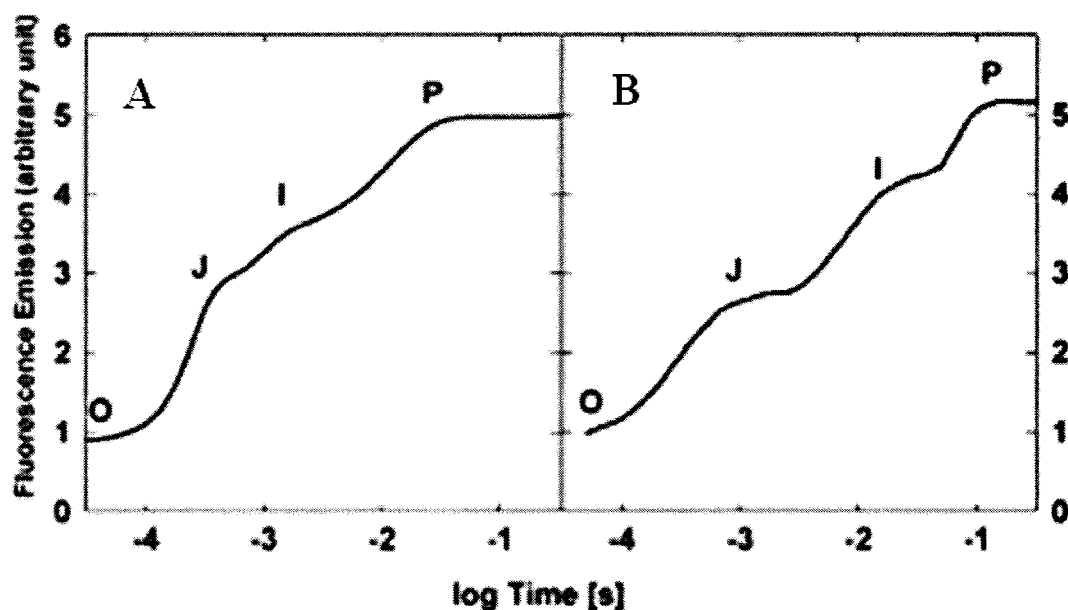


Figure 1.14 Représentation de courbe d'induction de fluorescence reconstituée à l'aide d'un modèle théorique (A) et obtenue expérimentalement (B) Tiré de Xin Guang Zhu *et al.*(13)

1.18 Les modèles par décomposition de courbes

Certains auteurs ont tenté l'approche inverse des modèles théoriques: tenter d'obtenir des analyses quantitatives à partir de décomposition des courbes d'induction de fluorescence. Pospisil et Dau ont été les pionniers dans la tentative de décomposer une courbe d'induction de fluorescence en ses plus simples composants. Ils ont déterminé qu'il était possible de décomposer les courbes en 3 composantes exponentielles qui représentaient très bien les phases O-I, J-I et I-P (48, 52, 53). Si les

conclusions des travaux de Pospisil et Dau sont relativement simples, c'est-à-dire que l'on peut approximer une courbe d'induction de fluorescence des membranes thylacoïdiennes par trois montées exponentielles distinctes, leurs analyses mathématiques restaient tout de même complexes et faisaient toujours appel à la détermination manuelle de certains paramètres nécessaire à la décomposition. Par exemple, dans leurs décompositions, Pospisil et Dau utilisait Excel (Microsoft, USA) qui est incapable de faire des régressions non linéaires donc d'analyser des courbes exponentielles. Ils devaient donc transformer les montées exponentielles en droites, ce qu'ils réalisaient en effectuant une régression linéaire sur la partie linéaire d'un graphique semi-logarithmique du signal d'induction de fluorescence en fonction du temps. On soustrayait alors la composante linéaire trouvée du graphique et on recommençait la procédure pour chaque composante. Cette méthode implique toutefois que Pospisil et Dau devaient fixer la valeur de la constante de vitesse de la phase O-J. Donc un des paramètres de l'équation n'était plus libre (52, 53).

1.18.1 Paramètres utilisables des analyses par décomposition de courbes

Lorsque l'on décompose mathématiquement les courbes d'induction de fluorescence en montées exponentielles distinctes à l'aide d'un système d'équations exponentielles représentant une somme de trois cinétiques d'ordre 1, il est possible de déterminer certains paramètres comme l'amplitude de chaque montée de même que leur constante de vitesse (ou le temps de demi vie) associée. L'amplitude décrit la « hauteur » de la phase dans un graphique alors que le temps de demi vie représente le temps nécessaire afin de compléter la moitié de cette phase. Ces deux paramètres numériques pourront alors être comparés, par exemple, entre un sujet témoin et un sujet traité.

1.18.2 Énergie d'activation

Les modèles, tant théoriques que par décomposition, utilisent les constantes de vitesse k pour représenter la vitesse des réactions composant chacune des phases. La différence majeure cependant est que dans le cas des modèles théoriques, on considère toutes les réactions individuelles et leurs constantes de vitesses associées. Cependant,

ces modèles ne permettent pas de déterminer les valeurs des constantes de vitesse et ces données doivent donc être tirées de la littérature (12, 13). Les modèles par décomposition nous permettent eux de calculer les valeurs des constantes de vitesses, mais seulement pour chaque phase et non chaque réaction fine impliquée dans ces phases.

Puisque l'on peut mesurer les constantes de vitesse des différentes réactions photosynthétique, on peut utiliser la loi d'Arrhenius et introduire la notion d'énergie d'activation (24) :

$$k = Be^{\frac{-E_A}{RT}}$$

Où k est la constante de vitesse de la phase en question, B est le facteur pré-exponentiel, E_A est l'énergie d'activation en J mol^{-1} , R est la constante des gaz ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) et T est la température en degré Kelvin.

La mesure de la constante k à différentes températures permet de faire un graphique du logarithme naturel de k en fonction de l'inverse de la température. Comme les termes B et R sont des constantes, la pente d'un tel graphique ($-E_a/RT$) donnera accès à l'énergie d'activation E_A .

L'énergie d'activation est définie comme étant la barrière d'énergie qu'une molécule doit franchir afin de pouvoir participer à une réaction chimique. L'énergie d'activation d'une réaction peut être amenée à varier de plusieurs façons. Par exemple, la présence d'un inhibiteur ou à l'opposé d'un catalyseur de la réaction chimique étudiée peut faire varier l'énergie d'activation (24).

Il est important de saisir la différence entre l'énergie d'activation et la constante de vitesse. Il est possible que la vitesse d'une réaction chimique change, donc que k varie, alors que la barrière d'énergie pour cette même réaction ne changera pas. Donc la réaction serait plus lente ou plus rapide, mais ne demanderait pas plus d'énergie pour se

produire. Pour cette raison, le calcul de l'énergie d'activation nous apporte des informations additionnelles à la constante de vitesse.

1.19 Objectifs du projet

L'objectif du présent projet de recherche est de trouver une méthode quantitative d'analyse des courbes d'induction de fluorescence, de valider cette méthode et de déterminer l'origine des différentes phases dans l'induction de fluorescence des membranes thylacoïdiennes. Pour ce faire, nous allons utiliser l'induction de fluorescence d'isolations de membranes thylacoïdiennes d'épinards que nous allons traiter avec deux produits dont les effets sont déjà bien connus dans la littérature, le diuron (DCMU) et le DPQ (décylplastoquinone).

La problématique rencontrée lors des analyses d'induction de fluorescence est importante, et se résume entre autres à un manque de compréhension au sujet de l'origine des phases et le besoin d'avoir une méthode quantitative d'analyse. L'induction de fluorescence est une méthode largement répandue dans l'analyse en photosynthèse ; la résolution de ces problèmes d'analyse serait bénéfique. La technique d'analyse que nous avons utilisée est inspirée de celle qui a été mise au point par Pospisil et Dau, c'est-à-dire une analyse par décomposition des courbes d'induction de fluorescence. Cependant contrairement à Pospisil et Dau, nous voulons développer une méthode entièrement standardisée faite par ordinateur et où aucun paramètre ne serait fixé.

Pour ce faire, nous allons décomposer nos courbes d'inductions de fluorescence en deux ou trois composantes exponentielles distinctes par régression non-linéaire à l'aide d'un logiciel informatique. À partir de cette décomposition des courbes, nous pourrions extraire plusieurs paramètres quantitatifs, entre autres les amplitudes et les temps de demi-vie de chaque phase et également, en changeant la température de l'échantillon, l'énergie d'activation apparente de chaque phase.

De façon pratique, cela voudra dire qu'il faut commencer par fabriquer une cuvette avec laquelle on peut mesurer les courbes d'induction de fluorescence à des températures variables afin de pouvoir déterminer les énergies d'activation apparentes. La cuvette livrée avec le fluorimètre Plant Efficiency Analyser (PEA) n'est pas conçue pour cet usage. La conception de cette cuvette devra prendre en compte le besoin d'avoir un contrôle précis et reproductible de la température.

Une fois la cuvette terminée et testée, il faut valider la méthode d'analyse. À cette fin, nous avons sélectionné deux produits dont les effets sont déjà connus dans la littérature c'est-à-dire le DCMU et le dPQ. De plus, ces deux composés agissent à différents endroits dans le transport d'électrons, le DCMU agit en bloquant le transport d'électrons au delà de Q_A alors que l'ajout de dPQ vient élargir artificiellement le bassin de PQ endogènes. Déterminer l'effet précis de ces deux composés sur l'induction de fluorescence pourra nous aider dans l'identification de l'origine des différentes phases.

Finalement, si les résultats sont concluants, nous devrions pouvoir élucider l'origine des phases O-J, J-I et I-P dans l'induction de fluorescence du PSII. Si tout fonctionne bien, nous aurons déterminé trois nouveaux paramètres quantitatifs soit l'amplitude de chaque phase, le temps de demi vie et l'énergie d'activation.

Donc, en résumé, les objectifs de ce projet sont :

- Créer une cuvette où la température sera ajustable
- Tester la méthode d'analyse de l'induction de fluorescence par composantes
- Déterminer le nombre de composantes (2 ou 3)
- Faire les tests avec les différents produits et décomposer les courbes afin d'extraire amplitude et temps de demi vie
- Faire les test avec les différentes produits en modifiant la température et décomposer les courbes afin d'extraire l'énergie d'activation
- Tenter avec ces informations d'élucider l'origine des phases O-J-I-P

CHAPITRE II

PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

2.1 Préparations des membranes thylacoïdiennes

Les membranes thylacoïdiennes ont été préparées à l'aide d'épinards frais (*Spinacia oleracea*) achetés au marché selon la méthode de Bukhov *et al.* (54). Le culot contenant les membranes thylacoïdiennes a été resuspendu dans un tampon à pH 7,5 contenant 20 mM Hepes-NaOH, 10 mM NaCl et 2 mM MgCl₂.

2.2 Évaluation du contenu en chlorophylle

Un aliquot de 10 µL de la solution de membranes thylacoïdiennes a été dissout dans 5 mL d'acétone 80%. À la suite d'une centrifugation, cette solution fut introduite dans un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 40 (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA) et les mesures d'absorbance ont été prises à 664 et 647 nm. L'équation utilisée pour la détermination du contenu en chlorophylle est la suivante :

$$\text{Concentration (mg/mL)} = 0,5 \times (7,34 A_{664} + 17,76 A_{647})$$

Où Concentration est la concentration de l'échantillon en chlorophylle, A_{664} est l'absorbance de l'échantillon à 664 nm et A_{647} est l'absorbance à 647 nm. (55)

2.3 Description de la cuvette utilisée en induction de fluorescence

Le contrôle de la température dans la cuvette fabriquée au laboratoire (figure 2.1), utilisée pour les mesures d'induction de fluorescence, était constitué d'une plaque Peltier couverte d'une mince couche de cuivre (Duratec, Marlow Industries Inc., Dallas, TX, USA) pour l'ajustement de la température et d'une sonde thermocouple mince reliée à un voltmètre pour la lecture de la température. La quantité d'énergie transmise à la plaque Peltier était contrôlée par un bloc d'alimentation d'électrophorèse Power Pack 200 (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA) pouvant fournir jusqu'à 2 ampères de courant électrique. La chaleur créée par la plaque Peltier était dissipée à l'aide d'un dissipateur de chaleur en aluminium et de deux petits ventilateurs. Une plaque de

plastique résistante à la chaleur de 10 mm d'épaisseur au centre de laquelle était percé un trou de 25 mm de diamètre servait de puit pour l'échantillon. Le volume total de ce puit était de 4 mL. (voir figure 2.1)

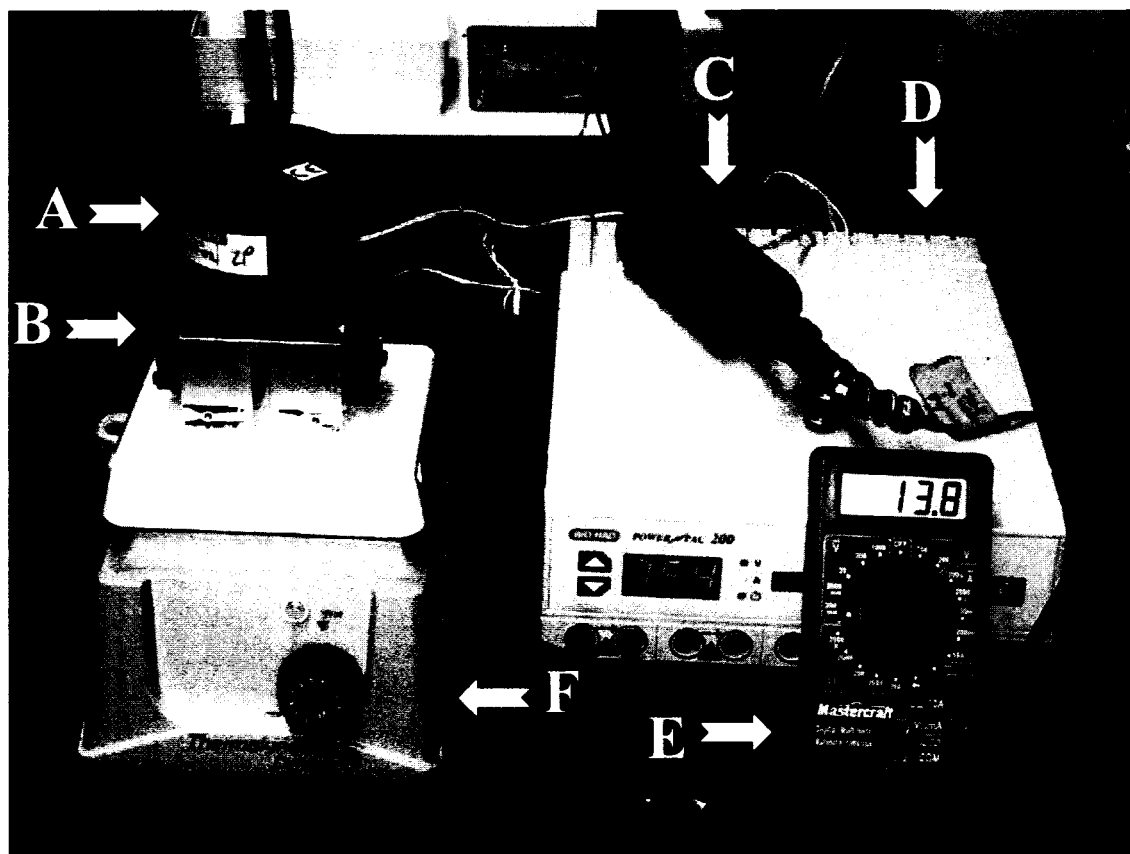


Figure 2.1 Illustration de la cuvette maison utilisée pour les mesures. On peut y voir la sonde du PEA (A), le bloc de dissipation de chaleur et les ventilateurs (B), le module thermocouple (C), la source d'alimentation (D), le voltmètre servant à lire la température (E) et finalement la plaque agitatrice (F).

2.4 Préparation des échantillons pour les mesures d'induction de fluorescence

Pour les mesures d'induction de fluorescence, l'échantillon de thylacoïdes a été dilué à 50 μg Chl/mL pour un volume total de 4 mL dans un tampon contenant 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 20 mM KCl, 10 mM NaCl et 2 mM MgCl_2 . Les solutions de DCMU et de dPQ ont été préparées dans l'éthanol et ajoutées à l'échantillon pour une incubation dans le noir de 2 minutes. La concentration d'éthanol a toujours été

maintenue à moins de 0,8% (V/V) afin de ne pas nuire aux membranes thylacoïdiennes. Le fluorimètre utilisé pour toutes les mesures d'induction de fluorescence fut le Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King'Lynn, Norfolk, UK) illustré dans la figure 2.2. La cuvette a été ajustée et conçue afin de pouvoir recevoir un agitateur magnétique. Pour les mesures, des membranes thylacoïdiennes adaptées dans le noir ont été excitées avec une lumière rouge actinique saturante à l'aide d'un réseau de diodes excitant à 655 nm) et fournissant une intensité de $3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La fluorescence était détectée en utilisant une photodiode de type PIN après un passage dans un filtre permettant la transmission de 50% de la lumière à 720 nm. Le signal de fluorescence des 40 premières μs étant un artefact de mesure relié au temps de réponse de l'instrument, ces données n'ont pas été incluses dans les analyses des tracés d'induction de fluorescence.

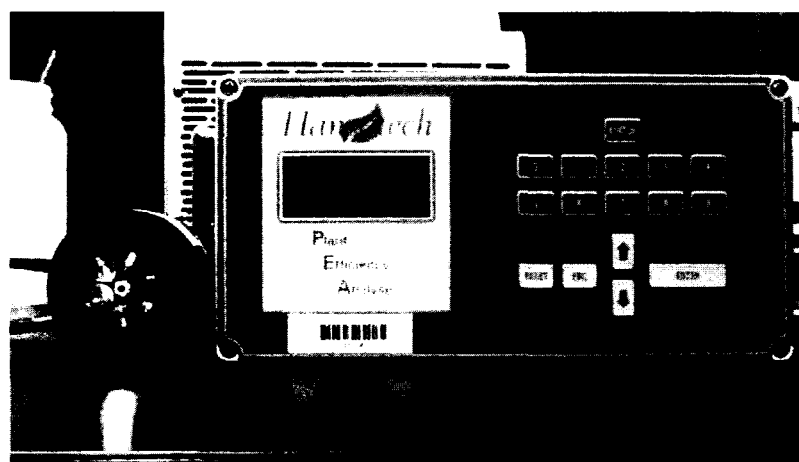


Figure 2.2 Illustration du Plant Efficiency analyser de Hansatech. Dans cette illustration, la sonde est en mode émission/lecture et on y aperçoit une lumière rouge de forte intensité

2.5 Analyses des données

Pour les analyses quantitatives, les tracés d'induction de fluorescence ont été simulés à l'aide d'une somme de trois cinétiques de premier ordre à l'aide d'un logiciel d'analyse mathématique permettant de faire des régressions non-linéaires, Sigma Plot (SSI, Richmond, California, USA), selon l'équation suivante :

$$F(t) = F_0 + A_{O-J} \left(1 - e^{-k_{O-J}t}\right) + A_{J-I} \left(1 - e^{-k_{J-I}t}\right) + A_{I-P} \left(1 - e^{-k_{I-P}t}\right)$$

Équation 2.1

Où $F(t)$ représente le niveau de fluorescence à un temps t , F_0 est la fluorescence, A_{O-J} , A_{J-I} et A_{I-P} sont les amplitudes des différentes phases alors que k_{O-J} , k_{J-I} et k_{I-P} sont les constantes de vitesse de ces même phases.

L'énergie d'activation E_A pour chaque phase a été calculée à l'aide de la loi d'Arrhenius décrite par l'équation suivante :

$$k = Be^{\frac{-E_A}{RT}}$$

Équation 2.2

Où k est la constante de vitesse de la décomposition de la phase en question, B est le facteur pré exponentiel, E_A est l'énergie d'activation en $J \text{ mol}^{-1}$, R est la constante des gaz ($8.314 J \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) et T est la température en Kelvin. Les logarithmes naturels des constantes de vitesse calculées à partir des décompositions ont été mis en graphique en fonction de l'inverse de la température en Kelvin. Dans un graphique de ce type, l'énergie d'activation en eV (E_A) est représentée par la pente que l'on multiplie par la constante des gaz et que l'on divise par la constante de Faraday.

CHAPITRE III
QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE EXPERIMENTAL O-J-I-P
CHLOROPHYLL FLUORESCENCE INDUCTION KINETICS: APPARENT
ACTIVATION ENERGY AND ORIGIN OF EACH KINETIC STEP

Le contenu de ce chapitre fait l'objet d'une publication en 2006 dans le journal *FEBS Journal* : Boisvert S., Joly D., et Carpentier, R., Quantitative analysis of the experimental O-J-I-P chlorophyll fluorescence induction kinetics: apparent activation energy and origin of each kinetic step, vol. 273(20): 4770-4777

3.1 Résumé

L'induction de fluorescence a été étudiée durant plus de 70 ans, mais il y a toujours des questions en suspens quant à l'origine des phases cinétiques O-J-I-P. La plupart des études s'entendent pour dire que la montée O-J est reliée à la réduction de l'accepteur primaire du PSII, mais plusieurs théories contradictoires existent en ce qui concerne les montés J-I et I-P. Un des problèmes de l'analyse des courbes d'induction de fluorescence est que la majorité des études faites à ce jour utilisent une méthode qualitative ou semi-quantitative en analysant visuellement les tracés afin d'observer les changements majeurs des courbes. Cette méthode est utile pour observer les changements importants dans les courbes d'induction de fluorescence cependant pour les changements plus subtils, mais significatifs, une méthode quantitative est nécessaire. Pour accomplir cela, nous avons développé une méthode d'analyse par décomposition des courbes permettant d'extraire les amplitudes et les temps de demi vie des trois composantes majeures des tracés d'induction de fluorescence mesurés dans les membranes thylacoïdiennes à différentes températures. Les énergies d'activation apparentes ont également été obtenues pour chaque étape cinétique. Nos résultats ont mis en évidence que chaque phase possède une énergie d'activation différente ($E_{A\ O-J} < E_{A\ J-I} < E_{A\ I-P}$) et que chaque phase représente donc une réaction différente. Les effets de deux composés bien connus, le DCMU, qui bloque le transport d'électrons à l'accepteur secondaire du PSII, et le dPQ qui réagit de la même façon que le bassin de plastoquinones endogènes, ont été étudiés. L'action de ces deux produits sur les paramètres quantitatifs permet de discuter de l'origine de chacune des phases O-J-I-P.

Steve Boisvert, David Joly and Robert Carpentier *

Groupe de Recherche en Biologie Végétale (GRBV), Université du Québec à Trois-Rivières, C.P.500 Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Corresponding author:

Professor Robert Carpentier

Phone : +1-819-376-5011

Fax : +1-819-376-5057

Email address: robert.carpentier@uqtr.ca

Key words: Chlorophyll fluorescence; Photosystem II; DCMU; Plastoquinone; Thylakoid

Abbreviations: A_{O-J} , A_{J-I} , and A_{I-P} , amplitude of O-J, J-I, and I-P phase, respectively; Chl, chlorophyll; DCMU, 3-3,4-dichlorophenyl-1,1-dimethylurea; dPQ, decylplastoquinone; E_A , activation energy; E_m , redox potential; F_0 , initial fluorescence; F_m , maximal fluorescence level; FI, fluorescence induction; NPQ, non-photochemical quenching; PQ, plastoquinone; PS, photosystem; Q_A and Q_B , primary and secondary quinone acceptors of photosystem II; $t_{1/2 O-J}$, $t_{1/2 J-I}$, and $t_{1/2 I-P}$, half-times of O-J, J-I, and I-P phase, respectively

3.2 Abstract

Fluorescence induction (FI) has been studied for a long period of time, but there are still questions on what O-J-I-P kinetics steps stand for. Most studies agree that O-J rise is related to photosystem II (PSII) primary acceptor (Q_A) reduction, but several contradictory theories exist for J-I and I-P rise. One problem with FI analysis is that most work done to date uses only qualitative or semi-quantitative data analysis by visually comparing traces to see the effects of different chemicals or treatments. While this method is useful to observe major changes, a quantitative method must be used to see more subtle, yet important, differences in the FI trace. To achieve this, we used a relatively simple mathematical approach to extract the amplitudes and half-times of the three major FI phases obtained from traces measured in thylakoid membranes kept at various temperatures. Apparent activation energies (E_A) were also obtained for each kinetic step. Our results show each phase has a different E_A with $E_{A\ O-J} < E_{A\ J-I} < E_{A\ I-P}$ and thus a different origin. The effects of two well known chemicals, DCMU, which blocks electron transfer to PSII secondary electron acceptor (Q_B), and decyl-plastoquinone, which acts similarly to endogenous reducible plastoquinones, on the quantitative parameters are discussed in terms of the origin of each kinetic phase.

3.3 Introduction

Measurement of Chlorophyll (Chl) *a* fluorescence constitutes one of the oldest approach to investigate photosynthesis, the first Chl fluorescence experiments being reported more than seventy years ago [1; for a detailed review, see ref 2]. Monitoring fluorescence induction (FI) has become widespread to probe photosystem II (PSII)

mostly because it is non invasive, easy, fast, reliable, and requires relatively inexpensive equipment [3]. When dark-adapted photosynthetic samples are excited with actinic light, FI is characterized by the initial fluorescence level (F_0 or O) that represents excitation energy dissipated as photons before it reaches open reaction centers and a subsequent rise from F_0 to maximal level (F_m or P) related to a series of successive events that lead to the progressive reduction of the quinone molecules located on the acceptor side of PSII [3].

The progressive reduction of the acceptor side of PSII leads to three distinct major phases of fluorescence rise from O to P with two intermediate steps J (I_1) and I (I_2) [4-6]. While it is generally accepted that the O-J phase is related to the PSII primary electron acceptor (Q_A) reduction [6-8], the origin of J-I and I-P phases is still a matter of debate [3,9-11]. Some authors attributed both of the two latter phases to the reduction of the acceptor side of PSII [9,12,13], or more specifically to the reduction of two distinct plastoquinone (PQ) pools [8,14,15]. Schreiber [11] also proposed that the J-I phase is related to the events on the donor side of PSII. Membrane potential changes were also reported to affect J-I [16] and I-P phases [17].

Most studies using FI presented only a qualitative analysis of the experimental fluorescence rise, i.e. visual comparison between traces obtained from control and treated photosynthetic samples [3,9,18,19]. The amplitude of Chl fluorescence at steps J, I, and P can be determined semi-quantitatively thus reflecting the sequential reduction of the acceptor side components of photosystem II but the characteristics of each phase such as its rate constant cannot be assessed. While this approach is useful to observe

major changes in the FI, the accurate characteristics of experimental induction phases are almost impossible to evaluate. Pospisil and Dau [16,20] have shown that the FI traces in isolated thylakoid membranes can be modelled by the superposition of the exponential rise to analyse quantitatively the contribution of each phase. The amplitude and rate constant of each of the three phases can be calculated by deconvolution of the traces into the three corresponding exponential rise.

In the present study, we provide a quantitative analysis of FI kinetics in thylakoid membranes affected by two compounds with known effects on FI: 3,4-dichlorophenyl-1,1-dimethylurea (DCMU) and decyl-plastoquinone (dPQ). DCMU is known to bind in the PSII Q_B pocket, which blocks electron transfer beyond Q_A and prevents reduction of the PQ pool by PSII [21,22]. On the other hand, dPQ can be used as an exogenous PQ molecule reducible by PSII [13]. The quantitative approach used here provided the apparent activation energy (E_A) of each FI kinetic step from their rate constant. Our results indicate a different bioenergetics origin for each kinetic step of the FI rise as they have different apparent E_A with $E_{A\ O-J} < E_{A\ J-I} < E_{A\ I-P}$. In addition, we clearly show that the J-I phase, in opposition to the I-P phase, is not directly related to the reduction of the PQ pool.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Thylakoid membranes preparation

Thylakoid membranes were isolated from fresh market spinach (*Spinacia oleracea*) as described by Joly *et al* [9]. Chlorophyll concentration was calculated following the procedure outlined in [35].

3.4.2 Sample preparation for fluorescence induction measurements

The temperature of the thylakoid suspensions was controlled by a 40x40 mm thermoelectric Peltier plate (Duratec, Marlow Industries Inc., Dallas, TX, USA). A thin thermocouple sensor (EXTECH Instruments Corp, Waltham, Maryland, USA) was placed in the center of the Peltier plate and was covered by a thin copper plate. A 10 mm thick heat-resistant plastic plate with a cylindrical hole of 25 mm diameter was stuck on the thin copper plate and used as a sample well. Before FI measurements, thylakoids were diluted to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in a total volume of 4 mL in a buffer containing 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 10 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , and 20 mM KCl. DCMU and dPQ were prepared in ethanol and then added to the sample for a 2 min incubation. Ethanol concentration was kept below 0.8% (v/v) for all measurements. Plant Efficiency Analyser (Hansatech, King' Lynn, Norfolk, UK) was used to measure FI. Dark-adapted thylakoids were excited with saturating red actinic light from an array of 655 nm light-emitting diodes at an intensity of 3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Fluorescence was detected using a PIN-photodiode after passing through a long-pass filter (50% transmission at 720 nm). As the fluorescence signal during the first 40 μs is ascribed for artifacts due to delay in response time of the instrument, these data were not included in analyses of FI traces.

3.4.3 Data analysis

For quantitative analysis, FI traces were fitted with the sum of three first order kinetics by non-linear regression using Sigma Plot (SSI, Richmond, California, USA):

$$F(t) = F_0 + A_{O-J} \left(1 - e^{-k_{O-J}t}\right) + A_{J-I} \left(1 - e^{-k_{J-I}t}\right) + A_{I-P} \left(1 - e^{-k_{I-P}t}\right)$$

where $F(t)$ is the fluorescence at time t , F_0 is the initial fluorescence, A_{O-J} , A_{J-I} and A_{I-P} are the amplitudes, k_{O-J} , k_{J-I} and k_{I-P} are the rate constants of the O-J, J-I and I-P steps of the fluorescence transient.

E_A were calculated using Arrhenius Law:

$$k = Be^{\frac{-E_A}{RT}}$$

where k is the rate constant obtained by deconvolution, B is the pre-exponential factor, E_A is the activation energy in J mol^{-1} , R is the gas constant ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) and T is the temperature in K. Natural logarithm of rate constants obtained from simulations were plotted versus T^{-1} . E_A in eV was extracted from the slope by multiplication of its value with the gas constant followed by division with the Faraday constant.

3.5 Results

As reported in the literature, the I step of the O-J-I-P fluorescence transient cannot be clearly distinguished by visual analysis of the FI traces obtained from untreated thylakoids [23 and references therein]. However, three exponential components are needed to correctly fit the FI traces [16]. Fig. 1 shows a typical trace of Chl a FI in isolated thylakoids at 21°C and its simulation by the sum of three exponential components that represent O-J, J-I, and I-P phases. As reported previously [16], the use of three components provided an excellent fit while two components were not enough. The good fit obtained by this type of non-linear regression shows that the method can be used as an excellent approximation of FI traces and to quantitatively estimate the contribution of each phase. The average values of amplitudes and half-times ($t_{1/2}$) found

for each phase of the FI measured at a light intensity of $3000 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ are presented in Table I. O-J was the most important phase with a relative amplitude of $47 \pm 5 \%$, followed by J-I ($32 \pm 5\%$) and I-P ($22 \pm 2 \%$). Fig. 1 also shows that a clear separation and distinction between the kinetics of each rise is achieved. The half-times of O-J, J-I, and I-P rises were $0.20 \pm 0.02 \text{ ms}$, $7.4 \pm 0.6 \text{ ms}$, and $42 \pm 3 \text{ ms}$, respectively.

In Fig. 2, we show FI traces for untreated thylakoids incubated at maximal and minimal temperature used in this work, 15°C and 25°C . FI traces for thylakoids treated with $1 \mu\text{M}$ DCMU and $1 \mu\text{M}$ dPQ, at both temperatures, are also presented. We used a low non-saturating concentration of DCMU to observe the effect of a reduced rate of plastoquinone reduction on FI, thus the triphasic fluorescence rise was preserved. At this concentration, only a fraction of the PSII centers are inhibited for Q_B reduction by binding of a DCMU molecule in the Q_B pocket, the remaining PSII centers are unaffected. However, a saturating concentration of DCMU would inhibit completely the activity of PSII by preventing the reduction of the PQ pool [21,22] and that changes drastically the typical FI trace of thylakoids by eliminating the J-P rise [4,24]. Also, for experiments with dPQ, low concentrations corresponding to less than 10 dPQ/PSII were used to have an appreciable effect on FI trace while avoiding excessive concentration that could quench the fluorescence signal. Also, it was shown that at this concentration, dPQ can be reduced by PSII like endogenous quinines [13].

Visual inspection of the traces in Fig. 2 indicates that for all treatments, the FI rise was faster at 25°C than at 15°C and that the contribution from O-J phase decreased at high temperature. Fig. 3 represents the amplitudes and half-times obtained by

deconvolution of each kinetic step of FI traces presented in Fig. 2. The simulations provided fits that are as good as for Fig. 1 for all the experimental traces shown in Fig. 2. Fig. 3 shows that indeed O-J amplitude decreased when temperature is raised from 15°C to 25°C. However, the numerical data also demonstrated that this decrease was compensated by an increase in the J-I phase. We also observed that half-times at 15°C were always higher than at 25°C for all steps in all experiments, meaning that all kinetic steps are faster when temperature is raised. DCMU effect on the traces was to increase the amplitude of step J with the concurrent decline of I step and to retard the rise to F_m . For dPQ, J step was lowered and the subsequent rise was retarded.

Knowing kinetic information about each phase can be of great help to learn about the bioenergetics of the FI rise. In fact, the rate constants calculated for each phase at different temperatures can be used to find the apparent E_A values from the Arrhenius plots. We chose to measure FI in thylakoids in the absence of additives or in the presence of 1 μ M DCMU or dPQ over a range of temperature from 15°C to 25°C. The range of temperature was set knowing that the membrane transition temperature in thylakoids is around 9-13°C [25]. The upper limit was set at 25°C to prevent any inhibition of the OEC by elevated temperature [26] and to have a temperature range distributed around room temperature.

An Arrhenius plot for each kinetic step is shown in Fig. 4 for untreated thylakoids and thylakoids treated with 1 μ M DCMU. E_A values were significantly different for each phase, with $E_{A\ O-J} < E_{A\ J-I} < E_{A\ I-P}$. It was observed that only $E_{A\ O-J}$ was affected by the presence of DCMU. It was lowered from 0.109 ± 0.009 eV in untreated thylakoids to

0.059 ± 0.005 eV in the presence of DCMU. E_A values for control thylakoids and $1 \mu\text{M}$ dPQ treated thylakoids are shown in Fig. 5. E_A was unaffected by the addition of dPQ : all data remained in error bar range for control and dPQ treated thylakoids for all kinetic steps.

3.6 Discussion

It has been widely reported from studies using intact leaves or thylakoid membranes that Chl FI from O to P is composed of three major phases namely, O-J, J-I, and I-P with apparent J, I, and P steps [3-6,27]. These phases emerge from a series of reactions leading to the full reduction of the quinone molecules located on the acceptor side of PSII. Previous work done using a qualitative or semi-quantitative analysis of experimental FI traces from thylakoid membranes limited the available information. In particular, the characteristics of the J-I phase are almost impossible to determine from visual analysis of the traces. It was shown that the three phases can be quantitatively resolved using a sum of three exponential functions as a model to simulate experimental FI traces of thylakoid membrane preparations [16]. This procedure does not take into account the physical events that occur in PSII but provide a useful mean of analysing the FI traces. In the present study, we used this approach as proposed by Pospisil and Dau [16,20] to evaluate the contributions and kinetics of the three main components of the FI traces. Deconvolution of the traces with the sum of three exponential rises provided an excellent fit between simulated and experimental traces (Fig. 1). FI traces obtained from thylakoids were composed of three well-distinct phases in terms of amplitude and half-time (Table I).

In contrast with the I peak observed in FI of intact leaves, the middle step J-I is not usually apparent as a peak in FI of isolated thylakoid membranes. Thus, several authors have evaluated the fluorescence intensity at I by simply using the fluorescence level observed at a specific time point that should correspond to the end of the J-I phase [8,28,29]. It is likely that the emergence of a peak for I in the FI curves depends on the relative amplitude and rate constant of the J-I phase compared to the amplitudes and rate constants of the two other phases. The above should be governed by the balance between the rate of reduction and oxidation of the acceptor side of PSII by the available electron transport pathways, which should be different in isolated thylakoid membranes due to the absence of stromal components (such as NADPH, ferredoxin, etc...) that are depleted during isolation. That difference may account for the absence of an apparent I peak in the FI traces of isolated thylakoid membranes. Indeed, a I-peak can be observed for thylakoid membranes if electron transport is modified such as with appropriate concentrations of N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine [23,24].

The use of a non-saturating concentration of DCMU, an inhibitor known to close PSII RC by binding in the Q_B pocket and blocking electron transfer from Q_A to Q_B [21,22], is of importance to modulate the dynamics of PQ pool reduction and determine its effect on FI kinetics as discussed below. The increase in A_{O-J} observed in the present study at low DCMU concentration is explained by the increased accumulation of Q_A^- in PSII centers that are affected by the non-saturating concentration of inhibitor [7,8]. The E_m of Q_A is raised in the presence of DCMU in the Q_B pocket, making it energetically easier to reduce Q_A [30-32]. In our experiments, a decrease in E_{A-O-J} by about 50% was observed. This result is consistent with the idea that the O-J rise is effectively related to

the redox state of Q_A which depends on the balance between its reduction by PSII and its reoxidation by Q_B . Indeed, the reduced $E_{A\ O-J}$ observed when DCMU is present is likely to reflect a reduced energetic demand for this phase as the competing reoxidation of Q_A^- by Q_B is removed in PSII centers affected by the inhibitor. Conversely, $E_{A\ J-I}$ and $E_{A\ I-P}$ were not modified by DCMU at the concentration used because the remaining J-I and I-P amplitudes originate from PSII centers not affected by DCMU (see below).

Addition of DCMU to thylakoids decreased A_{J-I} by more than 60%. This decrease indicates the J-I rise does not occur in DCMU inhibited PSII centers and that all the reduction of Q_A in DCMU-inhibited PSII is accounted for by the O-J phase. Interestingly, this decrease of A_{J-I} was compensated by the equivalent increase of A_{O-J} , making the sum of contributions from A_{O-J} and A_{J-I} equal for control and DCMU-treated thylakoids (Fig. 3). Moreover, all traces were similarly affected by an increase of temperature from 15 to 25 °C: A_{O-J} decreased while A_{J-I} increased by similar proportions with the elevated temperature. Hence, O-J and J-I seem to represent two distinct dissipative pathways with different E_A leading to the full closure of PSII RC at the I step of FI rise. These observations support the idea that the J-I rise is related to events happening in the reaction center before PQ pool reduction. Some authors have proposed that the J-I phase is due to the removal of non-photochemical quenching caused by reduction of the PQ molecule bound in the Q_B pocket [6,7,13]. The above findings are in agreement with the most recent theoretical model of FI calculated from the energy and electron transfer reactions involved in the reduction of the acceptor side of PSII [33]. In this simulated model the J-I phase was calculated to be simultaneous with the initial formation of PSII centers with doubly reduced Q_B . This may be

simultaneous with the formation of a transmembrane voltage as valinomycin was shown to inhibit the J-I phase of thylakoid membranes [16]. It is thus clear that with a saturating concentration of DCMU, Q_A is fully reduced at J-step as indicated previously [24]. In the absence of DCMU, Q_A can be fully reduced only when doubly reduced Q_B is present, which occurs at I-step [33].

The origin of both J-I and I-P phases, with half-times of 7.4 ± 0.6 ms and 42 ± 3 ms, has often been attributed to the reduction of the PQ pool. Some authors have proposed that these phases represent the reduction of a fast granal PQ pool and a slow stromal PQ pool, respectively [8,14,15]. However, Joliot *et al.* [34] found a half reduction time, under saturating light, of 25-60 ms for the fast pool and 0.8-1 s for the slow pool. While the half reduction time for the fast pool is in agreement with the half-time found in this work for the I-P rise, reduction of the slow PQ pool is clearly too slow to participate in the O-J-I-P rise, reaching F_m in less than 600 ms.

The I-P rise was slowed by more than two times after addition of $1 \mu\text{M}$ DCMU, but its amplitude was only slightly decreased. This observation is easily explained by the fact that a non-saturating concentration of DCMU was used, meaning that only a fraction of the PSII RC was affected by DCMU. Then, the intact fraction of PSII was able to reduce almost all PQ molecules, but a longer period of time was required because of the increased PQ pool size per functional PSII. This is in agreement with the unaffected $E_{A \text{ I-P}}$ found with the addition of $1 \mu\text{M}$ DCMU. In contrast, the amplitude and half-time of J-I phase were both decreased with DCMU demonstrating that J-I rise is not directly related to the reduction of the PQ pool.

A further analysis of the influence of PQ reduction on FI was obtained by addition of dPQ to the thylakoid samples. Treatment of thylakoids with 1 μ M dPQ had no effect on E_A for any phase. In fact, exogenous dPQ molecules added to thylakoids can be reduced by the acceptor side of PSII [13] and this artificially increased PQ pool size did not modify the chemistry of reactions involved in each phase. However, A_{O-J} was decreased because of the non-photochemical quenching exerted by the added oxidized dPQ molecules. Hence, corresponding increases in A_{I-P} and $t_{1/2 I-P}$ (A_{J-I} remained stable) were observed, thus confirming the relationship between I-P and removal of quinone non-photochemical quenching by reduction of the PQ pool.

With added dPQ, $t_{1/2 J-I}$ was slowed by only about 35% compared to about 250% for $t_{1/2 I-P}$. Joliot *et al.* [34] found that the redistribution of PQ molecules between fast and slow pools has an half-time of about 6 s. In this work, thylakoids were incubated 2 min in the presence of exogenous dPQ before FI measurements, thus added dPQ would have been certainly well-distributed among fast and slow pools. Since J-I phase was only slightly affected by dPQ compared to I-P phase, it further shows that J-I phase is not directly linked to the PQ pool size and its reduction as it is for I-P.

In conclusion, a simple quantitative analysis of the O-J-I-P rise was shown to be a useful model to evaluate efficiently the participation of the three major steps of experimental FI traces obtained from thylakoid membranes. Such analysis is needed for a more complete use of FI in the study of PSII electron transport and to obtain a more complete analysis of the O-J, J-I, and I-P rises. This method was also used to find

apparent activations energies of each phase. The different activation energies found is consistent with different processes being involved in each step.

3.7 Acknowledgements

This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT). D.J. is recipient of graduate fellowships from FQRNT and NSERC. Also, the authors thank Johanne Harnois for skillful professional assistance and Alain Gauthier for fruitful discussions about data analysis.

3.8 References

- [1] Kautsky H & Hirsch A (1931) Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 48, 964.
- [2] Papageogiou G & Govindjee (2004) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*, Springer edn. Dordrecht.
- [3] Lazar D (1999) Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta* 1412, 1-28.
- [4] Neubauer C & Schreiber U (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side. *Z Naturforsch* 42c, 1246-1254.

- [5] Schreiber U & Neubauer C (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Z Naturforsch* 42c, 1255-1264.
- [6] Strasser RJ & Govindjee (1992) On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Research in Photosynthesis* (Murata,N., ed), pp. 23-32. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [7] Samson G, Prasil O & Yaakoubd B (1999) Photochemical and thermal phases of chlorophyll a fluorescence. *Photosynthetica* 37, 163-182.
- [8] Strasser RJ, Srivastava A & Govindjee (1995) Polyphasic Chlorophyll a Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 61, 32-42.
- [9] Joly D, Bigras C, Harnois J, Govindachary S & Carpentier R (2005) Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes. *Photosynth Res* 84, 107-112.
- [10] Schansker G, Toth SZ & Strasser RJ (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochim Biophys Acta* 1706, 250-261.
- [11] Schreiber U (2002) Assesment of maximal fluorescence yield: Donor-side dependent quenching and QB-Quenching. In *Plant Spectrofluorometry*:

Applications and Basic Research (Kooten, O.V. & Snel, J.F.H., eds), pp. 23-47.

Rozenberg, Amsterdam.

- [12] Vernotte C, Etienne AL & Briantais J-M (1979) Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. *Biochim Biophys Acta* 545, 519-527.
- [13] Yaakoubd B, Andersen R, Desjardins Y & Samson G (2002) Contributions of the free oxidized and Q(B)-bound plastoquinone molecules to the thermal phase of chlorophyll-alpha fluorescence. *Photosynth Res* 74, 251-257.
- [14] Barthelemy X, Popovic R & Franck F (1997) Studies on the O-J-I-P transient of chlorophyll fluorescence in relation to photosystem II assembly and heterogeneity in plastids of greening barley. *J Photochem Photobiol , B Biol* 39, 213-218.
- [15] Meunier PC & Bendall DS (1992) Analysis of fluorescence induction in thylakoids with the method of moments reveals 2 different active photosystem-II centers. *Photosynth Res* 32, 109-120.
- [16] Pospisil P & Dau H (2002) Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients. *Biochim Biophys Acta* 1554, 94-100.
- [17] Vredenberg WJ & Bulychiev AA (2002) Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo. *Bioelectrochemistry* 57, 123-128.

- [18] Toth SZ, Schansker G, Kissimon J, Kovacs L, Garab G & Strasser RJ (2005) Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol* 162, 181-194.
- [19] Srivastava A, Strasser RJ & Govindjee (1995) Differential effects of dimethylbenzoquinone and dichlorobenzoquinone on chlorophyll fluorescence transient in spinach thylakoids. *J Photochem Photobiol , B Biol* 31, 163-169.
- [20] Pospisil P & Dau H (2000) Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth Res* 65, 41-52.
- [21] Velthuys B (1981) Electron dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II. *FEBS Lett* 126, 277-281.
- [22] Wraight C (1981) Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence for a new model of herbicide activity. *Isr J Chem* 21, 348-354.
- [23] Bukhov NG, Govindachary S, Egorova EA, Joly D & Carpentier R (2003) N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids. *Biochim Biophys Acta* 1607, 91-96.
- [24] Bukhov NG, Egorova EA, Govindachary S & Carpentier R (2004) Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor

- or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids. *Biochim Biophys Acta* 1657, 121-130.
- [25] Murata N, Troughton JH & Fork DC (1975) Relationships between the transition of the physical phase of membrane lipids and photosynthetic parameters in *Anacystis nidulans* and jettuce and spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 56, 508-517.
- [26] Srivastava A, Guisse B, Greppin H & Strasser RJ (1997) Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP. *Biochim Biophys Acta* 1320, 95-106.
- [27] Lazár D (2006) The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct Plant Biol* 33, 9-30.
- [28] Haldimann P & Tsimilli-Michael M (2002) Mercury inhibits the non-photochemical reduction of plastoquinone by exogenous NADPH and NADH: evidence from measurements of the polyphasic chlorophyll a fluorescence rise in spinach chloroplasts. *Photosynth Res* 74, 37-50.
- [29] Sušila P, Lazár D, Ilik P, Tomek P & Nauš J (2004) The gradient of exciting radiation within a sample affects the relative height of steps in the fast chlorophyll a fluorescence rise. *Photosynthetica* 42, 161-172.
- [30] Fufezan C, Rutherford AW & Krieger-Liszkay A (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Lett* 532, 407-410.

- [31] Ishikita H & Knapp EW (2005) Control of quinone redox potentials in photosystem II: Electron transfer and photoprotection. *J Am Chem Soc* 127, 14714-14720.
- [32] Krieger-Liszkay A & Rutherford AW (1998) Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry* 37, 17339-17344.
- [33] Zhu XG, Govindjee, Baker N, deSturler E, Ort D & Long S (2005) Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II. *Planta* 223, 114-133.
- [34] Joliot P, Lavergne J & Beal D (1992) Plastoquinone compartmentation in chloroplasts .1. Evidence for domains with different rates of photo-reduction. *Biochim Biophys Acta* 1101, 1-12.
- [35] Porra RJ, Thompson WA & Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975, 384-394.

3.9 Figure and table

Figure 3.1 Typical trace of experimental Chl a fluorescence rise from O to P in isolated thylakoid membranes (open circles) and its simulation (full line) by three exponential components (O-J, J-I, and I-P) added to F_0 . For details see Materials and methods.

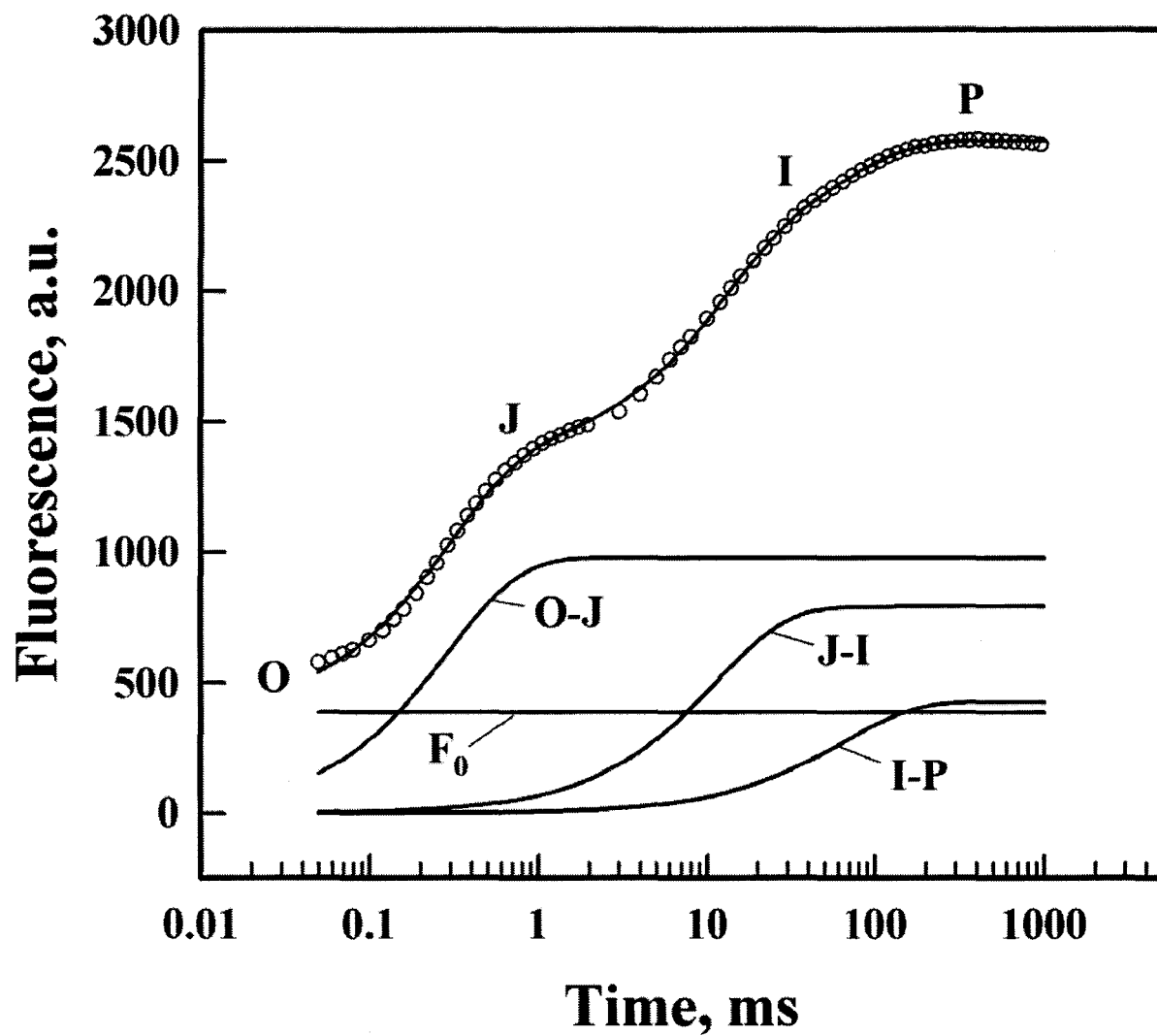


Figure 3.2 Traces of relative F_v rise kinetics (A) without additives at 15°C (1) and 25°C (2) or in the presence of 1 μ M DCMU at 15°C (3) and 25°C (4), or 1 μ M dPQ at 15°C (5) and 25°C (6)

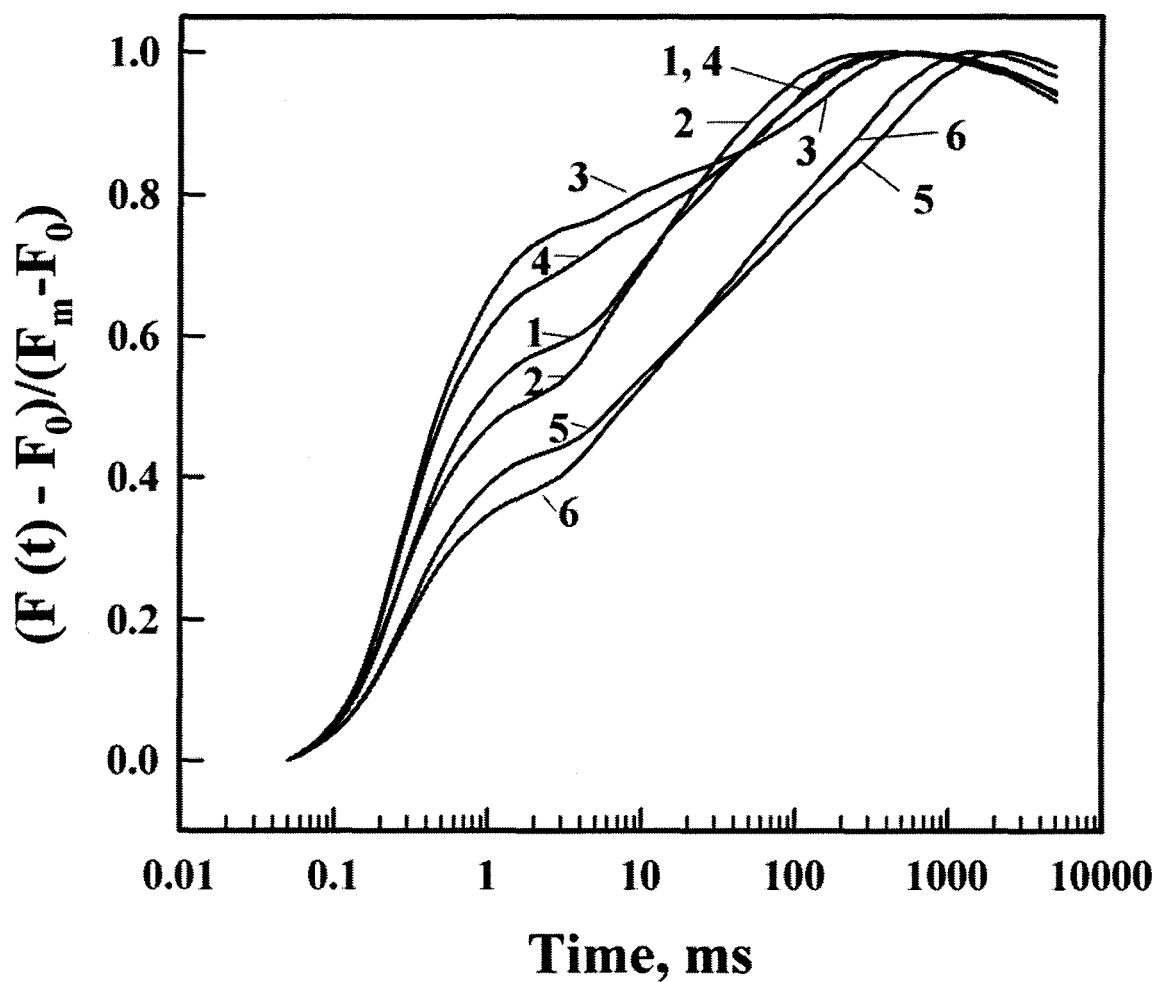


Figure 3.3 Amplitudes and time constants of the O-J, J-I and I-P phases simulated by exponential components at 15°C (light gray bars) and 25°C (dark gray bars) for thylakoids without additives (ctrl) or in the presence of 1 μ M DCMU, or 1 μ M dPQ, respectively. Amplitudes of each phase (A_{O-J} , A_{J-I} , A_{I-P}) are given in percentage of Fv. Results are means \pm S.D. (n=4)

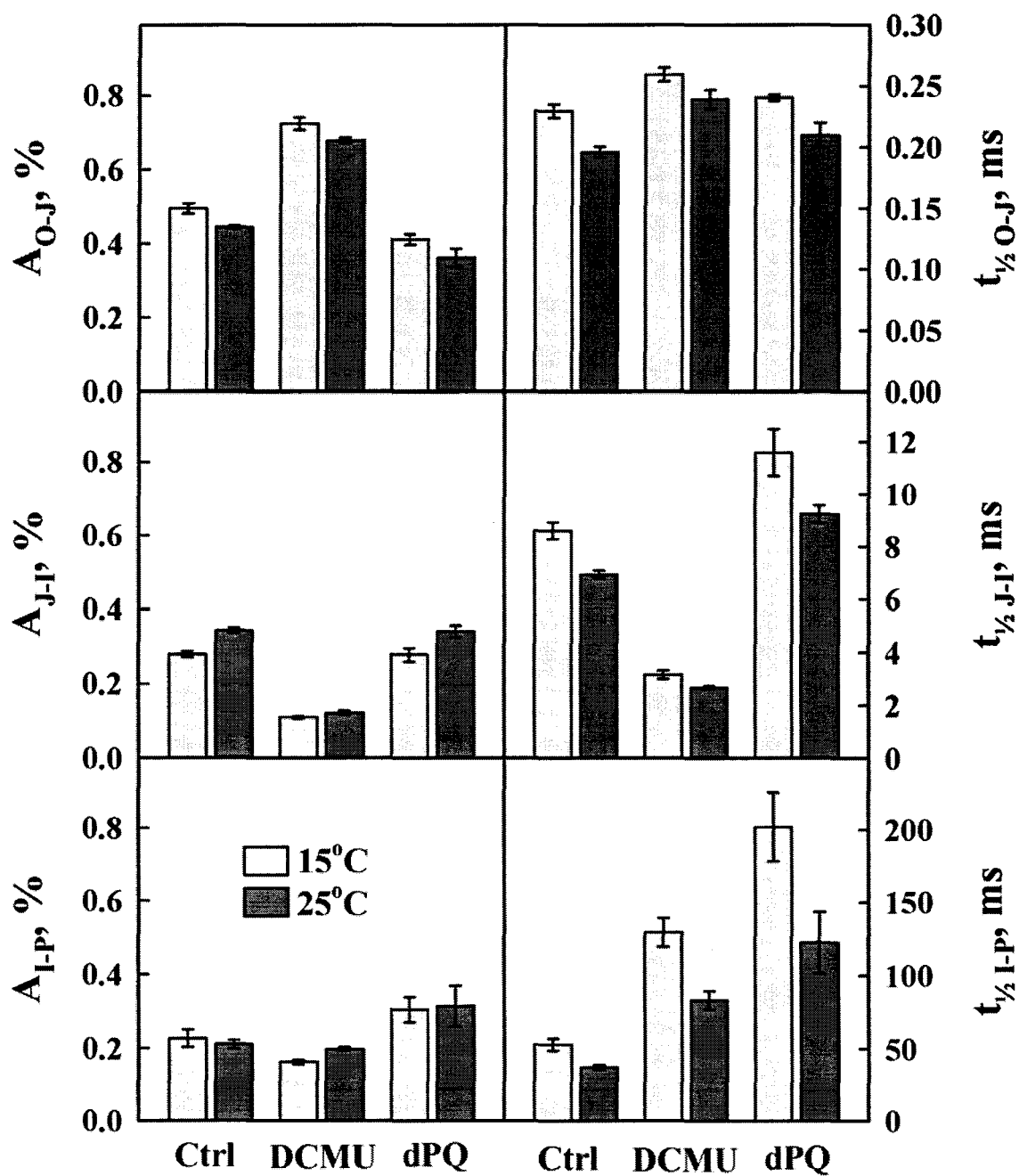


Figure 3.4 Arrhenius plots of rate constants of O-J (A), J-I (B) and I-P (C) rise of the fluorescence transients without additives (closed circles) or in the presence of 1 μ M DCMU (open circles). E_A are \pm S.D. calculated from linear regression (n=4)

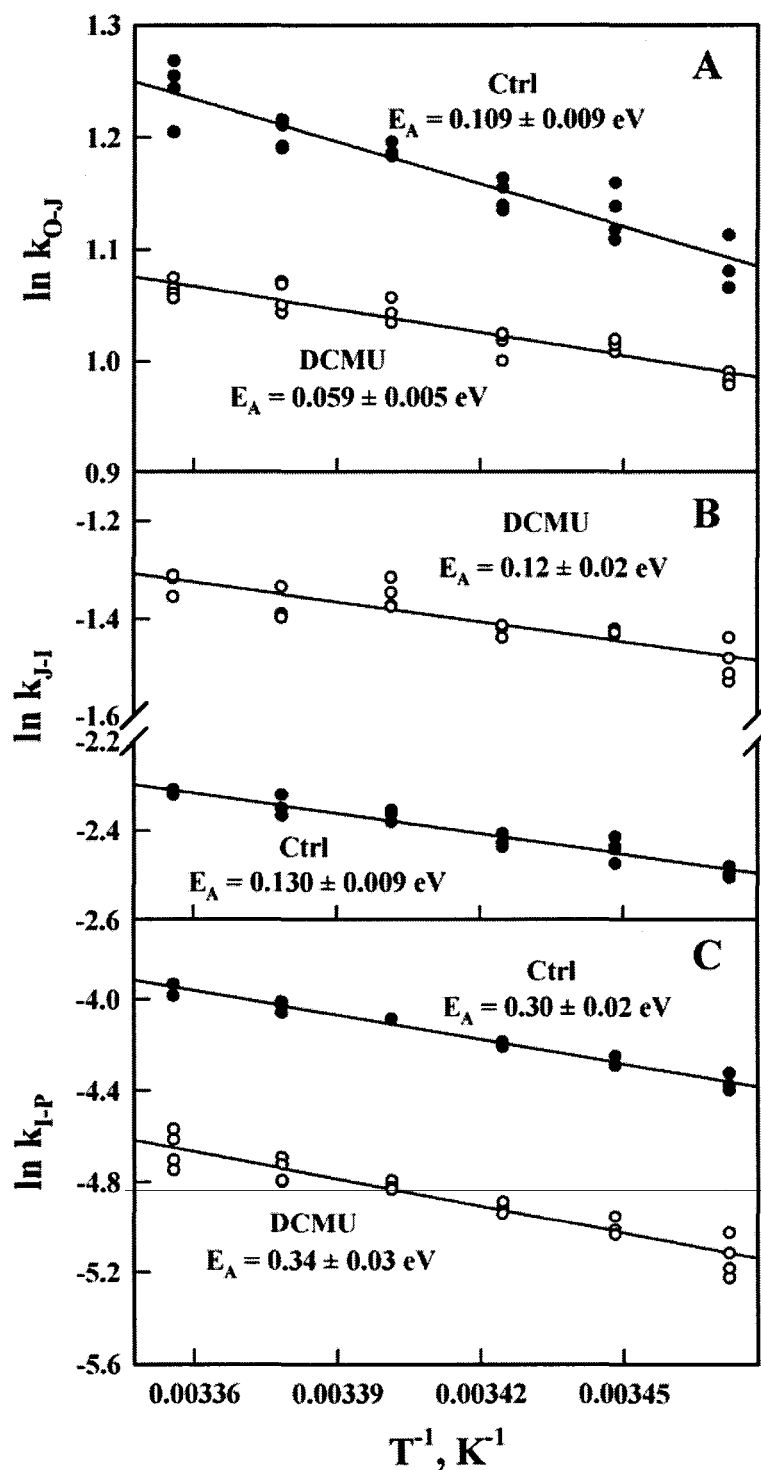


Figure 3.5 Arrhenius plots of rate constants of O-J (A), J-I (B) and I-P (C) rise of the fluorescence transients without additives (closed circles) or in the presence of 1 μ M dPQ (open circles). E_A are \pm S.D. calculated from linear regression (n=4)

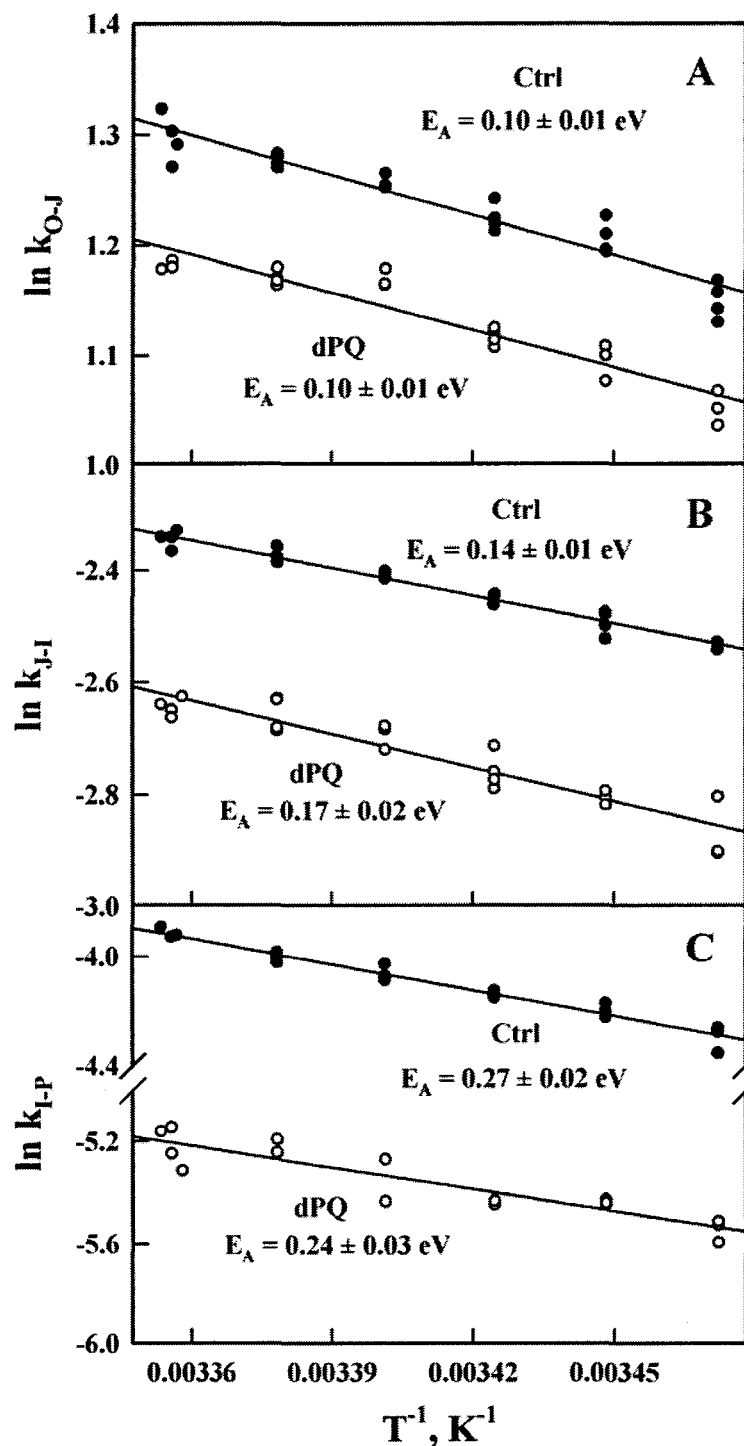


Tableau 3.1 Quantitative analysis of FI in spinach thylakoids at 21°C FI traces were fitted with three exponential rises corresponding to O-J, J-I, and I-P phases. Results are averages \pm S.D., (n = 8)

Phase	Amplitude (% of F_v)	$t_{1/2}$ (ms)
O-J	47 ± 5	0.20 ± 0.02
J-I	32 ± 5	7.4 ± 0.6
I-P	22 ± 2	42 ± 3

CHAPITRE 4

DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Analyse des performances et des améliorations apportées à la cuvette

Avant de discuter des résultats expérimentaux, nous allons tout d'abord analyser les performances de la cuvette maison, fabriquée pour permettre la mesure de courbes d'induction de fluorescence à différentes températures. Comme la conception de cette cuvette représente une partie majeure du projet, nous allons en faire l'historique et nous allons également discuter des problèmes rencontrés et des solutions trouvées.

Il faut tout d'abord dire que la cuvette est inspirée de celle que nous utilisons pour faire de la thermoluminescence (TL) (56). En effet, il est nécessaire en TL d'obtenir des plages de température précise pour la prise des mesures. Cela nécessite des spécifications similaires à la cuvette nécessaire en induction de fluorescence. Pour cette raison, le premier design était fortement inspiré de la cuvette de la TL. Entre autre chose, la plaque Peltier, la sonde thermocouple et le puit à échantillon étaient les mêmes.

Cependant, il y a des différences entre le protocole expérimental utilisé pour effectuer des mesures en TL et celui de l'induction de fluorescence, comme par exemple la quantité d'échantillon nécessaire. En effet, si en TL une quantité de 200 μL est utilisée, en induction de fluorescence nous devons avoir un volume d'environ 4 mL pour obtenir un bon signal sans trop de bruit. On comprendra donc que si en TL la hauteur de la colonne de liquide est négligeable, en induction de fluorescence la colonne de liquide a une hauteur d'environ 2 cm. Comme la plaque Peltier, qui assure le contrôle de la température de l'échantillon, n'est en contact qu'avec la base de la colonne de liquide (elle est située dans le fond du puit à échantillon), une trop grande hauteur de la colonne entraîne la création d'un gradient de température dans l'échantillon.

Pour remédier à ce problème, nous avons tout d'abord tenté de diminuer la quantité de liquide afin d'éviter de créer un gradient de température significatif. Après quelques tests, il fut déterminé que le volume minimal nécessaire afin de conserver un

bon niveau de fluorescence était d'environ 3 mL (résultats non montrés). Comme nous n'arrivions pas à diminuer suffisamment la hauteur de la colonne de liquide, nous avons opté pour une agitation de l'échantillon afin d'obtenir une température homogène. Cela fut réalisé en ajoutant un barreau magnétique et une plaque agitatrice au montage. Toutefois, le dissipateur de chaleur métallique de la plaque Peltier interférait avec le champ magnétique si bien que le barreau magnétique refusait de se mettre en mouvement. Nous avons donc dû procéder à une révision du premier design de notre cuvette.

À l'origine, le montage était pourvu d'un ventilateur situé sous le dissipateur de chaleur et, afin d'éviter le contact des pales du ventilateur avec la surface sur laquelle il était posé, le montage était fixé sur des pattes. La solution apportée pour régler le problème de l'agitation fut d'éliminer le ventilateur situé sous le dissipateur de chaleur pour le remplacer par deux plus petits situés sur les côtés comme sur la figure 2.1. Cela éliminait également la nécessité des pattes car les pales du ventilateur n'étaient plus en contact avec la surface. Ces modifications ont permis de rapprocher le barreau magnétique de la plaque agitatrice et, bien que le champ magnétique était toujours affaibli par le dissipateur de chaleur, le barreau magnétique parvenait tout de même à accomplir son travail.

C'est ce second design de cuvette, identique à celui de la figure 2.1, qui a servi à prendre les mesures présentées dans l'article inclus dans ce travail. Lorsque l'article fut publié et que la validité de notre méthode fut acceptée dans la littérature, nous avons décidé d'investir du temps afin de moderniser la cuvette pour la rendre plus conviviale et plus performante. En effet, même si le deuxième design de notre cuvette était fonctionnel, la prise des mesures était fastidieuse et limitée pour plusieurs raisons.

Premièrement, l'ajustement manuel de la température sur le bloc d'alimentation d'électrophorèse demandait du temps et une bonne anticipation du comportement de la température. En effet, l'ajustement manuel ne permet pas de corrections fines de la

puissance transmise à la plaque Peltier, ce qui causait souvent le rejet de certaines mesures car la température fluctuait au cours de l'expérience.

Deuxièmement, la prise de la température par la sonde thermocouple avait lieu juste au dessus de la plaque Peltier, comme pour la TL. Bien que cette façon de faire soit très appropriée en TL, encore une fois dû à la faible hauteur de la colonne de liquide, cela ne nous semblait pas approprié pour notre volume de 4mL. En effet, la chaleur émise par la plaque Peltier pourrait être captée par la sonde thermocouple et fausser la mesure de la température par rapport à la moyenne de la colonne de liquide, même avec une agitation constante. Des mesures prises à l'aide d'un thermomètre standard ont en effet démontré une légère variation, d'une moyenne de 0,5-1°C, entre une prise de température sur la plaque Peltier et dans le haut de la colonne de liquide de l'échantillon (résultats non montrés).

Finalement, le montage était limité dans les températures pouvant être atteintes. En effet, certaines expériences demandaient une température sous le point de congélation, ce qui était impossible d'atteindre avec notre cuvette même à la puissance maximale de refroidissement de notre plaque Peltier.

Pour remédier à ces problèmes, nous avons donc fait quelques modifications. Tout d'abord nous avons remplacé le bloc d'alimentation électrophorétique par un module informatisé permettant de contrôler la plaque Peltier, ce qui permettait d'ajuster la température beaucoup plus rapidement et reproductiblement. En effet, ce module permet de corriger automatiquement la température plusieurs fois par seconde. De plus, le module peut ajuster la température aussi bien négativement que positivement alors que dans le cas du bloc d'alimentation électrophorétique, cela demandait d'inverser les fils d'alimentation.

De plus, pour la prise de la température dans la cuvette, le module utilise une sonde plus précise que l'ancien module thermocouple ($\pm 0,1^\circ\text{C}$ comparativement à $\pm 1^\circ\text{C}$). Aussi, la sonde de lecture de la température est maintenant située dans le milieu de la

colonne de liquide et non directement sur la plaque Peltier. Des mesures effectués à l'aide d'un thermomètre ont démontré une fluctuation d'environ $0,1^{\circ}\text{C}$ entre la température programmée et la température de l'échantillon. (résultats non montrés)

Également, le bloc d'alimentation utilisé par le module informatique est plus puissant que l'ancien bloc d'électrophorèse utilisé. De plus, le refroidissement de la plaque Peltier est maintenant assuré par une circulation d'eau gérée par un bain thermostaté. Ces deux modifications permettent maintenant d'obtenir des températures plus basses qu'avec le deuxième design de cuvette : une température de -5°C étant maintenant atteinte facilement lors des essais en utilisant un mélange eau/glycérol pour la circulation d'eau. Cette modification a également permis d'éliminer le bloc de dissipation de chaleur, et les interférences magnétiques qu'il représentait, ce qui permet d'optimiser l'agitation magnétique.

Finalement, le puit à échantillon a été remplacé par une nouvelle pièce entièrement usinée et conçue à cette fin, comprenant un compartiment pour la plaque Peltier, un orifice pour la sonde à température et un réceptacle prévu spécialement pour la sonde du PEA. Le nouveau montage est présenté à la figure 4.1



Figure 4.1 Illustration du dernier design de la cuvette maison utilisée pour les mesures. On peut y voir, le bloc de dissipation de chaleur alimenté par le bain thermostaté (A), le module informatisé (B), la source d'alimentation (C) et finalement la plaque agitatrice (D).

4.2 Justification des paramètres expérimentaux

Nous avons utilisé deux produits qui sont déjà bien documentés, le DCMU (57, 58) et le dPQ (38, 59). Nous avons fait ce choix car comme nous désirons valider une nouvelle méthode d'analyse, il est donc important de pouvoir confirmer que les résultats obtenus expérimentalement sont conformes à la littérature.

Il faut également justifier les choix des paramètres expérimentaux que nous avons utilisés. Tout d'abord, Il est important de comprendre que la concentration de DCMU utilisée pour les expériences est non saturante ($1 \mu\text{M}$). En effet, une quantité saturante de DCMU élimine entièrement la montée J-I-P (48) ce qui rend impossible la décomposition en trois montées exponentielles distinctes. Il est possible d'obtenir une simulation acceptable avec deux composantes, mais nous désirions conserver une courbe

triphasique afin de permettre une comparaison des valeurs quantitatives entre le témoin et les différents traitements. L'utilisation d'une concentration non saturante de DCMU permet d'affecter seulement un certain pourcentage des centres réactionnels et donc de conserver une courbe d'induction de fluorescence triphasique. Comme l'un de nos buts principaux était d'étudier l'origine des phases dans l'induction de fluorescence, nous désirions observer l'effet du DCMU sur toutes les phases de l'induction de fluorescence.

En ce qui concerne le dPQ, un autre genre de problème se présente : il est un atténuateur non photochimique de l'induction de fluorescence lorsqu'il est oxydé (38). Donc un ajout trop important de dPQ diminuerait beaucoup l'intensité du signal d'induction de fluorescence. Une concentration de 1 μM (environ 10 dPQ par centre réactionnel) a été jugée optimale car le signal n'est pas trop atténué et, comme rapporté dans la littérature, le dPQ est réductible par le PSII à cette concentration (59).

Finalement, en ce qui concerne la plage de température étudiée dans la détermination des énergies d'activation, il fut décidé d'utiliser une plage comprise entre 15 et 25°C pour plusieurs raisons. Premièrement, il est connu que le CEO peut subir des dommages et être inhibé lorsqu'il est exposé à de hautes températures, nous avons donc limité notre température maximale (60) car un CEO endommagé altérerait la quantité d'électrons pouvant être fournie aux photosystèmes, ce qui entraînerait une modification de la courbe d'induction de fluorescence et possiblement une cassure dans la courbe des énergies d'activation. En ce qui concerne la température minimale, nous désirions éviter d'atteindre la température de transition des membranes thylacoïdiennes ce qui aurait probablement entraîné une cassure dans la courbe d'énergie d'activation (61). De plus, cette plage de température est distribuée autour de la température de la pièce, une température où les membranes thylacoïdiennes sont réputées être fonctionnelles.

4.3 Analyse qualitative des résultats

Maintenant que les paramètres expérimentaux utilisés ont été discutés, passons à l'analyse qualitative des courbes d'induction de fluorescence. On peut observer les différents tracés dans la figure 3.2 pour le contrôle, le DCMU et les dPQ et ce pour les

températures minimales et maximales étudiées. Ce type de courbe est appelé de type V, c'est-à-dire que les données sont normalisées entre F_0 et F_m . Ce type de courbe est souvent utilisé pour les analyses qualitatives car il met en évidence les changements internes de la courbe (donc les changements dans O-J-I-P) au détriment des changements de F_0 et F_m . C'est donc un type de courbe approprié lorsque les variations de F_0 et F_m ne sont pas trop importantes. Dans le cas présent, ce type de courbe est utilisé car le but principal de l'expérience est justement de tenter de quantifier les changements dans les phases O-J, J-I et I-P et il est normal de vouloir mettre l'emphasis sur ces changements. De plus, les variations de F_0 et de F_m étaient mineures pour les différents traitements et conformes à ce qui avait été déjà établi dans la littérature (54, 62, 63). (résultats non montrés)

Débutons donc l'analyse en étudiant les variations dans le temps nécessaires à l'atteinte de F_m en fonction de la température. On observe dans la figure 3.2 que l'atteinte de F_m est plus rapide lorsque la température est plus élevée pour toutes les courbes. Cet effet était prévisible car, dans la mesure où l'on n'endommage pas les systèmes biochimiques et photosynthétiques, une augmentation de la température se résume généralement par une augmentation de la vitesse des réactions chimiques car il devient plus facile de franchir la barrière d'énergie d'activation (loi d'Arrhenius) (24, 64).

Cependant, lorsque la température reste constante, on observe que l'atteinte de F_m est plus lente dans les courbes traitées au DCMU et au dPQ que dans le cas de la courbe contrôle. Pour ce qui est du DCMU, cela est expliqué parce que la réduction du bassin de PQ est plus lente car une partie des PSII n'est plus compétente, le DCMU bloquant le transport d'électrons au delà de Q_A . Pour cette raison, la fraction des photosystèmes affectés par le DCMU ne pourra pas participer à la réduction du bassin de PQ et, comme l'atteinte de F_m est liée à la réduction complète du bassin de PQ, (13, 27) il faudra plus de temps pour atteindre F_m . Le raisonnement est similaire en ce qui concerne l'ajout de dPQ sauf que dans ce cas ci, ce n'est pas une réaction de la chaîne de transport d'électrons qui est affectée mais plutôt l'ajout d'un réactif, présent de façon endogène

dans les réactions photosynthétiques, qu'il faudra réduire avant d'atteindre F_m : le ratio PQ/photosystème compétent sera augmenté par l'ajout de dPQ et par le fait même le temps nécessaire à la réduction du bassin de PQ sera plus grand.

On observe également, de façon visuelle, une augmentation de la phase O-J pour les courbes traitées avec le DCMU par rapport au contrôle. Rappelons que la phase O-J représente l'accumulation de (ou les équilibres impliquant) Q_A réduit dans les photosystèmes. Il a été démontré que la présence de DCMU dans la pochette Q_B rend plus facile la réduction de Q_A par les photosystèmes et il est donc probable que cela cause une augmentation de la phase O-J (65-67). De plus, comme le DCMU empêche la réoxydation de Q_A , en bloquant le transfert de l'électron à Q_B , cela occasionne une accumulation plus rapide de Q_A réduit (57, 58). En ce qui concerne l'ajout de dPQ, on note une baisse de l'amplitude O-J qui est due au fait que les molécules de dPQ que l'on ajoute à l'échantillon sont en majeure partie oxydées. Nous avons déjà vu que le dPQ est un excellent atténuateur de la fluorescence. Comme la phase O-J est la plus rapide, et qu'elle est donc pratiquement terminée avant que la réduction du bassin de PQ ne se produise, O-J sera diminué par l'atténuation non photochimique de la fluorescence par les dPQ ajoutés (13, 38).

Cette analyse qualitative, bien que non exhaustive, est en parfait accord avec ce qui est publié dans la littérature et représente relativement bien les limites de ce que l'on peut faire actuellement en ce qui concerne les analyses qualitatives des courbes d'induction de fluorescence. L'information obtenue, bien que très utile, reste donc limitée surtout du point de vue quantitatif. En effet, les paramètres quantitatifs facilement calculables se limitent généralement à F_0 , F_m et F_v/F_m .

On observera également que s'il est facile de localiser les phases O-J et I-P sur les tracés d'induction de fluorescence des membranes thylacoïdiennes de la figure 3.2, il est très difficile de localiser la phase J-I particulièrement dans le cas de certains traitements.

4.4 Analyse des simulations des courbes d'induction de fluorescence

Avant de tenter d'analyser quantitativement les courbes d'induction de fluorescence, il fallait tout d'abord déterminer si nos décompositions, la base de la détermination des paramètres quantitatifs, approximaient bien les courbes expérimentales d'induction de fluorescence mesurée.

Nous avons donc décomposé en 3 montées exponentielles distinctes (conformément à l'équation 2.1), à l'aide de régression non-linéaires du logiciel SigmaPlot, une courbe d'induction de fluorescence de membranes thylacoïdiennes témoin. La figure 3.1 présente les résultats de la simulation, les cercles vides représentant la courbe originale et le trait plein la courbe reconstituée à partir des paramètres de F_0 , d'amplitude et de temps de demi-vie extraits par les régressions non-linéaires effectuées à l'aide de SigmaPlot.

On observe que la méthode approxime bien la courbe originale, le tracé reconstitué étant très près du tracé expérimental. Nous avons également représenté sur cette figure chacune des phases O-J-I-P individuellement, telle que calculé par chaque membre de l'équation 2.1, afin de représenter leur importance relative dans la courbe de même que la localisation du début chaque phase lors de l'induction de fluorescence. Nos résultats corroborent donc ceux de Pospisil et Dau à savoir que la courbe d'induction de fluorescence des membranes thylacoïdiennes s'approche bien à l'aide de trois composantes. Il semble donc improbable, comme nous l'avons déjà mentionné, que les courbes d'induction de fluorescence ne comportent que deux phases comme le pensent certains autres auteurs (48, 53, 68).

Toutefois, afin de s'assurer qu'il faut bel et bien trois composantes pour obtenir une bonne approximation, nous avons également tenté des simulations impliquant deux ou quatre montées exponentielles. Des variations de l'équation 2.1 ont été utilisées pour effectuer ces simulations. Les résultats sont donnés dans la figure 4.2. On observe que pour deux composantes, la courbe est mal simulée, particulièrement dans la zone de la phase J-I, ce qui permet de conclure que deux composantes sont insuffisantes. Comme

nous l'avons déjà vu, il est possible que les phases O-J et J-I se chevauchent lors d'induction de fluorescence des membranes thylacoïdiennes et cela pourrait expliquer pourquoi les analyses qualitatives ont de la difficulté à déceler sa présence (43). Toutefois, on s'aperçoit lors des analyses quantitatives que la phase J-I représente tout de même plus de 30% de l'amplitude totale de la courbe d'induction de fluorescence (voir figure 3.1 et tableau 3.1) et donc on ne peut l'ignorer.

En ce qui concerne la simulation à l'aide de quatre montées exponentielles, la courbe est bien simulée, mais le résultat ne présente pas d'amélioration significative par rapport à 3 composantes. En effet, les courbes à 3 et 4 composantes sont pratiquement superposées dans la figure 4.2. Dans ce genre d'analyse mathématique, la règle d'or est d'utiliser le moins de composantes possibles pour obtenir la meilleure simulation possible, sinon les composantes additionnelles n'ont plus de signification.

On note également que le F_0 calculé par la simulation se rapproche également beaucoup de la valeur F_0 calculé expérimentalement par le PEA. (résultats non montrés). Le F_0 représente, théoriquement, la fluorescence initiale des photosystèmes avant que le centre réactionnel du P680 puisse capter un électron, donc lorsque 100% des centres réactionnels sont ouverts. Pratiquement cependant, le F_0 que l'on mesure en laboratoire est différent du F_0 théorique. En effet, comme F_0 est une intensité de fluorescence, pour le mesurer on doit utiliser une source d'émission. Cette source d'émission constitue une source d'excitation des centres réactionnels qui ne seront donc plus à 100% ouvert. On peut contourner le problème en utilisant une source lumineuse de très faible intensité pour mesurer F_0 , ce qui excite un faible pourcentage des centres réactionnels et permet donc de donner une bonne approximation du F_0 . Le PEA toutefois ne fonctionne pas selon ce principe ; le F_0 est mesurée à l'aide d'une lumière de haute intensité et la valeur de F_0 est calculée à l'aide d'un algorithme. Nous n'avons pas accès à l'algorithme interne du PEA permettant le calcul de F_0 , mais il est intéressant de voir que l'équation 2.1 servant pour les décompositions donne des résultats similaires à ceux du PEA, dont les valeurs de F_0 sont acceptées dans la littérature (69, 70).

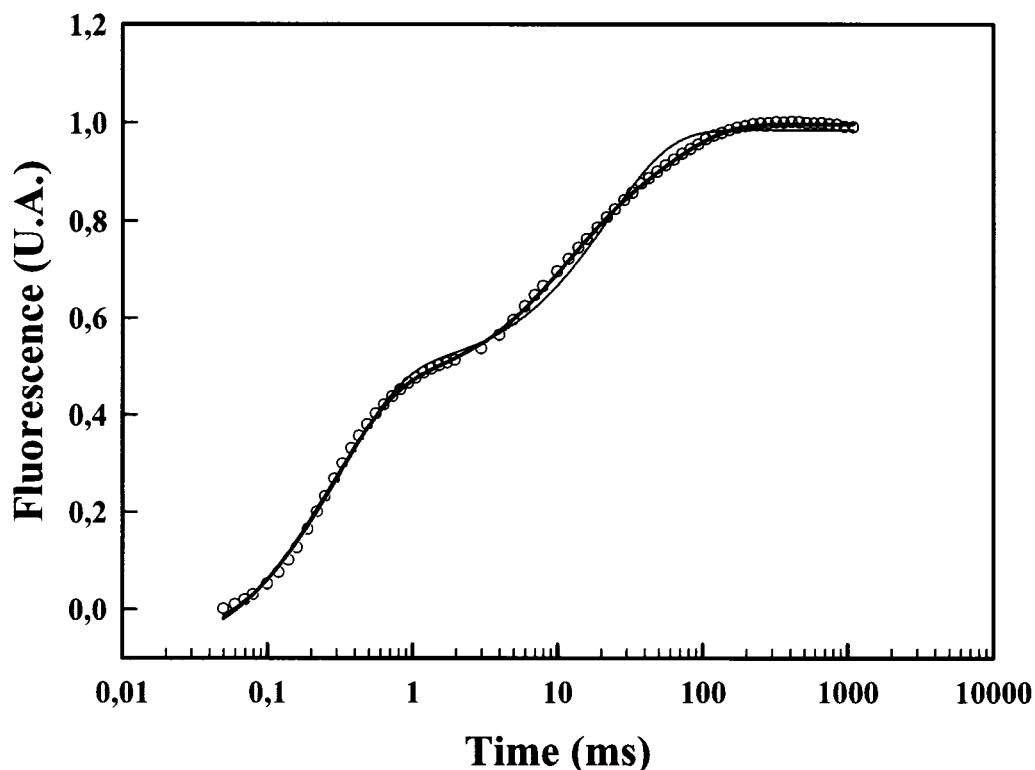


Figure 4.2 Simulation des courbes d'induction de fluorescence à l'aide de 2 composantes (rose), 3 composantes (bleu) ou 4 composantes (rouge). Le tracé original mesuré est représenté par les cercles vides. Afin de permettre l'observation des deux courbes superposés à 3 et 4 composantes, la courbe bleue a été mise en pointillé.

4.5 Analyse quantitative : amplitude et temps de demi-vie des phases

Maintenant que nous avons déterminé que notre méthode de décomposition des courbes approximaient bien les courbes d'induction de fluorescence, nous pouvons commencer l'analyse des paramètres quantitatifs obtenus à partir des décompositions. À l'aide de nos décompositions et à partir de l'équation 2.1, nous sommes en mesure de calculer deux paramètres quantitatifs pour chaque phase de l'induction de fluorescence: l'amplitude et la constante de temps. Par la suite, les constantes de temps sont transformées en temps de demi-vie ($t_{1/2}$), par une conversion mathématique simple (24).

Analysons donc les temps de demi-vie du témoin à la température pièce pour chaque phases (tableau 3.1) afin de voir si les résultats recoupent les données obtenues

dans la littérature concernant les différentes hypothèses sur l'origine des phases. Tout d'abord, en ce qui concerne O-J, nous avons calculé un temps de demi-vie 200 μ s. Cela correspond au temps de demi-vie, des équilibres d'accumulation de Q_A^- , variant de 140-400 μ s (71, 72).

Nous avons calculé un temps de demi-vie de 7,4 ms en ce qui concerne J-I. Toutefois, vu le nombre d'hypothèses différentes présentes dans la littérature quant à la provenance de la phase J-I, il est difficile de vérifier notre valeur. Cependant, il fut déterminé par Zhu *et al* (13), à l'aide de leur modèle théorique, que J-I semble correspondre aux concentrations maximales de l'espèce $Q_A^-Q_B^{2-}$.

Finalement en ce qui concerne la phase I-P, le temps de demi-vie de 42 ms calculé se rapproche beaucoup de la valeur de la littérature de 25-60 ms (73) concernant la réduction du bassin rapide de PQ. Toutefois, la valeur mesurée du temps de demi-vie pour le bassin lent de PQ est de 0,8-1s (73), une valeur qui ne cadre avec aucune des phases, le niveau F_m étant atteint après environ 600 ms. Il semble donc possible que la phase I-P soit reliée au bassin de PQ, mais l'hypothèse d'un bassin lent semble difficile à supporter à la lumière des temps de demi-vie calculés.

Il faut également comparer les données de temps de demi-vie obtenues avec celle obtenue par Pospisil et Dau, car ce sont leurs travaux qui sont à la base de l'analyse quantitative développée dans le cadre de ce projet. Les temps de demi-vie trouvés par Pospisil et Dau sont de 2,5 ms pour la phase O-J, 15 ms pour la phase J-I et 77 ms pour la phase I-P (48). On note donc que les temps de demi-vie trouvés par Pospisil et Dau pour J-I et I-P sont d'environ le double de ceux que nous avons calculés, alors que la différence pour O-J est d'environ 18 fois plus élevée. Comment expliquer cette différence ? L'explication ne peut pas provenir d'une différence d'intensité lumineuse, comme Pospisil et Dau utilisait une intensité lumineuse comparable à la nôtre, 3500 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ comparativement à 3000 μ mol photons $m^{-2} s^{-1}$ pour le PEA. Il faut cependant se rappeler que dans leur modèle, Pospisil et Dau devaient « fixer » la valeur du premier temps de demi-vie (48) : cette dernière était imposée dans l'équation initiale

alors que dans notre modèle, tous les paramètres sont libres. Il est évident que si l'on change la valeur du terme concernant la phase O-J de l'équation 2.1, les termes décrivant les autres phases vont également changer.

Passons maintenant à l'analyse des effets des différents produits sur les paramètres quantitatifs d'amplitudes et de temps de demi-vie illustrés dans la figure 3.3. On notera tout d'abord que la valeur des temps de demi-vie diminue toujours avec l'augmentation de la température pour toutes les courbes et tous les traitements. Nous devons faire appel ici à la même explication que celle utilisée pour l'atteinte plus rapide de F_m dans les analyses qualitatives : selon la loi d'Arrhenius, l'augmentation de la température augmente la vitesse des réactions chimiques car la barrière d'énergie à franchir est moins importante. Puisque la vitesse des réactions augmente, le temps de demi-vie correspondant va diminuer (13, 24).

Si on s'attarde maintenant aux amplitudes O-J et J-I de la figure 3.3, on pourra noter une deuxième propriété générale intéressante : l'augmentation de la température cause une diminution de la phase O-J qui est compensée par une augmentation de la phase J-I de sorte que la somme des deux reste la même. (voir tableau 4.1) Cette variation de O-J et J-I en fonction de la température est valide pour les courbes témoins et celles traitées au DCMU. On ne peut étudier la variation pour l'ajout de dPQ car la phase O-J, étant la plus rapide des trois phases, est plus atténué epar l'ajout de dPQ que la phase J-I. En effet, comme on peut le voir dans la figure 3.1, la phase O-J est terminée avant le début de la phase I-P, ce qui n'est pas le cas de la phase J-I. L'observation de l'additivité des phases O-J et J-I semble indiquer qu'il y a un possible lien à faire entre ces deux phases.

Traitement	Température (°C)	Amplitude O-J (% de Fv)	Amplitude J-I (% de Fv)	Amplitude J-I + O-J (% de Fv)
Témoin	15	49,47 ± 1,27	27,95 ± 0,83	77 ± 2
DCMU	15	72,36 ± 1,67	10,99 ± 0,31	83 ± 2
Témoin	25	44,46 ± 0,45	34,41 ± 0,7	79 ± 2
DCMU	25	67,90 ± 0,80	12,21 ± 0,5	80 ± 2

Tableau 4.1 Valeur des amplitudes O-J et J-I pour différents traitements. La somme des deux amplitudes est également représentée.

Passons maintenant aux effets spécifiques du DCMU sur les composantes quantitatives des courbes d'induction de fluorescence. On pourra d'abord noter une augmentation de l'amplitude de O-J, comme il fut observé lors de l'analyse qualitative et ce pour les mêmes raisons : la plus grande facilité à réduire Q_A en présence de DCMU. Deuxièmement, on observe une baisse marquée de l'amplitude de J-I. Cette baisse d'amplitude est expliquée aisément car les photosystèmes traités au DCMU ne présentent plus de montée J-I-P et donc l'amplitude J-I mesurée reflète seulement la portion des photosystèmes qui n'ont pas été affectés par le DCMU.

Finalement, on observe qu'en présence de DCMU, le temps de demi vie de I-P est grandement augmenté alors qu'à l'inverse celui de J-I est diminué. Comme la phase I-P est souvent associée à la réduction du bassin de PQ et que la présence de DCMU ralentit cette réduction en rendant une partie des photosystèmes non fonctionnels, nous pouvons facilement expliquer l'augmentation du temps de demi-vie de I-P. Toutefois, en ce qui concerne la diminution du temps de demi-vie de J-I, nous n'avons pas d'explications pour l'instant. Cependant, nous venons de trouver un argument contre l'hypothèse des deux bassins de PQ expliquant les origines des phases J-I et I-P. En effet, si J-I était relié au bassin lent de PQ et I-P au bassin rapide de PQ, on s'attendrait à ce que l'effet du DCMU sur les temps de demi-vie de ces deux phases soit identique, ce qui n'est manifestement pas le cas.

Les effets du dPQ sur les courbes d'induction de fluorescence sont également intéressants. Nous notons tout d'abord une diminution de l'amplitude O-J due à l'effet atténuateur des dPQ ajoutés à l'échantillon. Encore une fois, cette observation vient confirmer l'analyse qualitative faite plus tôt. Nous pouvons ensuite constater qu'à la fois les temps de demi-vie des phases J-I et I-P sont augmentés, ce qui à première vue semble suggérer, contrairement à ce que nous venons de voir, que ces deux phases sont reliées aux bassins lents et rapides de PQ. Cependant, l'augmentation du temps de demi-vie de J-I n'est que de 35% alors que l'augmentation de I-P est de 250%. (voir figure 3.2) Joliot (73) a démontré que le temps de migration des PQ entre les bassins lents et rapides était de 6 secondes. Comme l'incubation des membranes thylacoïdiennes avec les dPQ est de deux minutes, on s'attend à ce que les molécules de dPQ ajoutées soient redistribuées uniformément dans les deux bassins. Donc si l'hypothèse des deux bassins est valable, l'effet sur les temps de demi-vie des phases J-I et I-P devrait être semblable, ou à tout le moins dans le même ordre de grandeur, ce qui n'est manifestement pas le cas.

Finalement, nous observons une augmentation de l'amplitude de I-P explicable par l'ajout de dPQ oxydés dans l'échantillon qui, comme nous l'avons déjà vu, augmentent le niveau d'atténuation non-photochimique. Comme l'amplitude de la phase I-P est reliée à l'élimination de l'atténuation non photochimique du bassin de PQ (13, 27, 54), on s'attend à une augmentation de l'amplitude de la phase I-P lorsque l'on ajoute des dPQ. Les dPQ n'ont cependant aucun effet sur l'amplitude de J-I et encore une fois, ce résultat infirme l'hypothèse des deux bassins de PQ.

4.6 Détermination des énergies d'activation apparentes

Comme nous l'avons vu, la détermination des constantes de vitesse à différentes températures permet de calculer à l'aide de l'équation d'Arrhenius (équation 2.2), les énergies d'activation des phases O-J-I-P. (voir figure 3.4 et 3.5)

Habituellement, lorsque l'on calcule une énergie d'activation d'une réaction, on se sert de la constante de vitesse spécifique d'une réaction. Cependant, lorsque l'on

décompose les courbes d'induction de fluorescence en trois montées exponentielles, il est nécessaire de garder à l'esprit que les constantes de vitesses calculées de cette manière représentent plusieurs réactions et non une seule. En effet, il serait simpliste de penser que les courbes d'induction de fluorescence peuvent se résumer à trois réactions distinctes, ce qui est d'ailleurs démontré par la difficulté d'obtenir des modèles théoriques valables (12, 13). On doit donc conclure que les constantes de vitesses calculées par notre modèle de décomposition sont « apparentes » ou encore qu'elles sont la résultante de la sommation de plusieurs constantes de vitesse de réactions différentes. Il est probable que les trois montées exponentielles s'expliquent par des goulots d'étranglement dans les réactions, donc que l'ensemble des réactions soit limité par une qui est plus lente.

Voyons maintenant les résultats, présentés dans les figures 3.4 et 3.5, des expériences concernant l'énergie d'activation apparente. Si on analyse les résultats pour les membranes thylacoïdiennes témoins, on s'aperçoit que $E_{A\ O-J} < E_{A\ J-I} < E_{A\ I-P}$. Comme les E_A sont différentes, on peut donc conclure que les réactions biochimiques et photosynthétiques impliquées dans les phases O-J, J-I et I-P sont également différentes.

Analysons les résultats concernant l'énergie d'activation en présence de DCMU (voir figure 3.4). On note premièrement que $E_{A\ O-J}$ est abaissée par le traitement au DCMU par rapport au contrôle. En effet, il est démontré que l'ajout de DCMU à des membranes thylacoïdiennes rend plus facile la réduction de Q_A en abaissant son potentiel d'oxydoréduction. Il est donc normal que l'énergie d'activation associée à la phase O-J, qui représente les équilibres impliquant l'accumulation de Q_A réduit, soit plus faible.

On observe également que les énergies d'activation des phases J-I et I-P ne sont pas affectées. On se rappellera que le DCMU affecte l'induction de fluorescence en bloquant le transport d'électrons au delà de Q_A et qu'il inhibe les montés J-I et I-P. Donc seuls les systèmes non affectés par le DCMU contribueront aux E_A calculées pour J-I et

I-P. Ces photosystèmes se comporteront donc comme le contrôle en ce qui a trait à l' E_A et c'est ce que nous observons.

En ce qui concerne l'ajout de dPQ, on voit qu'il n'y a aucun effet majeur sur les E_A (voir figure 3.5). Cette absence de changement est toutefois facilement explicable car l'ajout de dPQ ne change la nature d'aucune des réactions chimiques des photosystèmes : on ne fait que rajouter un réactif qui agit comme celui déjà présent naturellement dans le milieu (PQ). Nous pouvons donc anticiper que certaines phases soient plus lentes, donc à un effet sur le temps de demi vie, à cause de l'ajout de dPQ supplémentaire à réduire mais les E_A ne devraient pas changer. C'est effectivement ce que nous observons.

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS

5.1 Conclusions sur la validité de la méthode

La décomposition en trois montées exponentielles donne d'excellents résultats en ce qui a trait à la simulation des courbes d'inductions de fluorescence des membranes thylacoïdiennes. Nous avons par le fait même confirmé la présence de trois phases dans les membranes thylacoïdiennes et non de seulement deux comme le pensaient certains auteurs dans la littérature.

Les nouveaux paramètres quantitatifs d'amplitude et de temps de demi vie que cette méthode nous permet de calculer ont démontré leur utilité dans l'analyse des courbes d'induction de fluorescence. Effectivement, l'effet du DCMU et du dPQ sur les paramètres quantitatifs des courbes d'induction de fluorescence est facilement explicable et conforme à la théorie comme nous l'avons vu.

Finalement, en utilisant une plage de température, nous avons pu déterminer un troisième paramètre quantitatif, l'énergie d'activation apparente, qui nous apporte encore davantage d'informations. Encore une fois, les variations du paramètre d' E_A sont logiques et conformes à la littérature.

Il est bon toutefois de rappeler également que cette méthode a des limitations. Entre autre, elle n'est présentement valide que pour les membranes thylacoïdiennes. On ne peut pas transposer cette méthode pour analyser les courbes d'induction de fluorescence de feuilles par exemple. En effet, une feuille complète est un système plus complexe qu'une isolation de matériel photosynthétique, ce qui entraîne parfois la présence de creux, une diminution temporaire du niveau de fluorescence lors d'une induction de fluorescence, (74) et la phase I-P ne semble pas être une montée exponentielle. Ces différences rendent difficiles, présentement, l'analyse par décomposition. Un raffinement de l'équation 2.1 semble donc nécessaire pour rendre l'analyse des feuilles par décomposition possible.

5.2 Révision des différentes hypothèses sur l'origine des phases J-I et I-P

Passons maintenant en revue les différentes hypothèses dont nous avons discuté auparavant en ce qui concerne l'origine des différentes phases J-I et I-P de l'induction de fluorescence.

Tout d'abord, nous avons une hypothèse selon laquelle J-I et I-P représentaient deux bassins de PQ, un rapide et un lent. Comme nous l'avons déjà vu, cette hypothèse ne semble pas plausible en regard du temps de demi-vie du bassin lent, de même que des résultats sur le DCMU et le dPQ. En effet, si J-I et I-P sont reliés au bassin de PQ, ils devraient avoir un comportement similaire lors d'un ajout de dPQ, ce qui n'est pas le cas, particulièrement pour les temps de demi vie. De plus, les temps de demi vie moyen du contrôle (tableau 3.1) sont de l'ordre de 7,4 et 42 ms pour J-I et I-P respectivement alors qu'il fut démontré que le temps de demi-vie de la réduction des deux supposés bassins de PQ sont de 25-60 milliseconde pour le rapide et de 0,8-1 seconde pour le lent (34, 36, 59, 73, 75).

En ce qui concerne l'hypothèse d'une branche alternative de transport d'électrons du PSII comme étant à l'origine de J-I, les résultats obtenus ne permettent pas de discriminer cette hypothèse. En effet, l'interdépendance des amplitudes O-J et J-I pourrait être reliée au fait que la voie active de transport d'électrons représentant O-J et la branche inactive soit affectée de façon différente par la température. Nous pouvons cependant ramener cette hypothèse à une formulation beaucoup plus générale : les phases O-J et J-I pourraient tout simplement être deux façons différentes d'atteindre la fermeture complète des centres réactionnels, et donc d'atteindre le niveau I, que ce soit par un effet du côté donneur ou du côté accepteur (40, 44, 76).

Il faut également mentionner une hypothèse selon laquelle la phase I-P serait due à l'action du PSI sur le PSII (45). Cette théorie découle d'expériences où, en stimulant l'activité du PSI, on affectait l'amplitude de la phase I-P. Nos expériences semblent toutefois discriminer cette théorie car l'ajout de dPQ, qui n'affecte pas l'activité du PSI, présente des effets importants sur la phase I-P. Cependant, il est vrai qu'une

augmentation de l'activité du PSI devrait logiquement affecter la phase I-P, mais indirectement. En effet, comme le PSI permet de réoxyder le bassin de PQ, et que la phase I-P semble être reliée au bassin de PQ, une augmentation de l'activité du PSI va donc forcément affecter le temps de demi-vie de la phase I-P, mais par ricochet et non directement. D'ailleurs, il fut publié par plusieurs auteurs que les isolations de membranes de PSII, qui sont des membranes dépourvues de PSI, présentent une phase I-P (77, 78).

Finalement, en ce qui concerne le gradient électrique formé par les photosystèmes exposés à la lumière, les résultats ne permettent aucunement de discriminer cette théorie. Il est possible en effet que le gradient ait un effet sur J-I et I-P car il ne faut pas oublier que les phases, telles que nous les déterminons, représentent un ensemble de réactions. Il est donc plausible que le potentiel membranaire fasse partie de cet ensemble de réactions et que sa modification entraîne un changement dans les phases J-I et I-P. Il se pourrait également que la modification du potentiel membranaire, dû à la formation d'un gradient électrique, modifie tout simplement un ou des équilibres majeurs impliqués dans les phases J-I et I-P. Des expériences supplémentaires seront nécessaires à l'aide de découpleurs de gradient de protons et de gradient électriques afin de vérifier l'effet sur les différentes phases (48, 49, 79).

5.3 Conclusion sur l'origine des phases

Revoyons maintenant les conclusions trouvées dans ce travail sur l'origine des phases O-J-I-P. En ce qui concerne la phase O-J, nos observations sont en accord avec la littérature à savoir que les équilibres impliquant l'accumulation de Q_A^- sont responsables de cette phase. En effet, nous avons vu que le DCMU entraîne l'augmentation de l'amplitude O-J et la diminution de l'énergie d'activation de O-J ce qui est en accord avec les données démontrant que le DCMU facilite l'accumulation de Q_A^- en diminuant son potentiel d'oxydoréduction.

En ce qui concerne la phase J-I, les résultats obtenus ne nous permettent pas de trancher définitivement, mais nous pouvons éliminer certaines hypothèses. Nous avons cependant fait une découverte intéressante : une baisse d'amplitude de O-J est presque toujours compensée par une augmentation d'amplitude de J-I, et vice versa lors de changements de température du milieu ou lors de l'ajout de DCMU. Il semble donc qu'il y ait une relation entre O-J et J-I ce qui laisse la porte ouverte à plusieurs hypothèses.

Finalement pour la phase I-P, nos résultats suggèrent que cette phase est reliée à l'élimination de l'atténuation non photochimique. En effet, l'ajout de dPQ sur la phase I-P est important : le temps de demi vie augmente de 250% et l'amplitude augmente également. De plus, l' E_A des phases n'est aucunement affectée car l'ajout de dPQ ne change rien aux réactions des photosystèmes. Il est donc logique de conclure que les dPQ ont un effet majeur sur la phase I-P seulement et que cette dernière est donc directement reliée au bassin de PQ.

5.4 Perspectives d'avenir

Comme nous avons pu le constater, les premières séries d'expériences publiées nous ont permis de valider notre méthode. Nous avons également réussi à obtenir des résultats intéressants en ce qui concerne l'origine des différentes phases : nous avons appuyé l'hypothèse selon laquelle O-J est reliée aux équilibres menant à l'accumulation de Q_A^- et démontré, avec certitude, que la phase I-P est fortement reliée au bassin de PQ. Cependant, bien que nous ayons trouvé quelques indices concernant la phase J-I et réussi à discriminer certaines hypothèses, les résultats obtenus ne permettent pas encore d'identifier l'origine de cette phase.

La prochaine étape sera de tenter d'identifier la signification de J-I. Des expériences récentes dans lesquelles nous modifions, à l'aide d'éclairs de courte durée, la population des quatre états S initiaux semblent prometteuses. En effet, les amplitudes des phases O-J et J-I semblent suivre les mêmes motifs que les populations des états S, c'est-à-dire une période de quatre. Selon nous, il serait possible que la vitesse à laquelle

le CEO peut donner ses électrons au $P680^+$ soit à l'origine des phases O-J et J-I. (voir figure 1.5)

Il faudra également travailler avec des découpleurs du gradient électrique et du gradient de protons des membranes thylacoïdiennes, par exemple la valinomycine, la nigericine et la thetoxine afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle ces gradients affectent les phases J-I et I-P. En effet, aucun de nos résultats actuels ne discrimine l'hypothèse selon laquelle les gradients électriques et de protons pourraient avoir un rôle à jouer dans les phases de l'induction de fluorescence.

De plus, la méthode devra également être validée dans d'autres types de matériel photosynthétique, par exemple les feuilles ou les isolations de particules de PSII. Les feuilles représentent un intérêt marqué car ce sont des systèmes intacts, contrairement aux isolations de matériel photosynthétique. Par contre, les courbes semblent être difficiles à décomposer, probablement en regard de la complexité beaucoup plus grande d'une feuille (enzyme, régénération des différentes protéines etc) par rapport à une isolation. Nous voulons également étudier l'autre extrémité : les particules des PSII. Ce sont, grosso modo, des membranes thylacoïdiennes ne comportant plus de cloisonnement intérieur ni de PSI. L'intérêt de ce type d'isolation est que nous pouvons étudier sélectivement le PSII, sans interaction du PSI.

Finalement, lorsque l'origine des phases sera clarifiée, nous pourrons reprendre plusieurs expériences passées dont les résultats étaient ambigus ou difficiles à traiter avec les méthodes qualitatives. Une foule de composés pourront également être testés afin de déterminer rapidement, et avec une précision raisonnable, leur site d'action dans la chaîne de transport photosynthétique du PSII. Nous pouvons entre autres penser à différents herbicides, polluants ou métaux lourds. Ce type d'étude pourrait également trouver une application pratique. En effet, la concentration des polluants et des métaux lourds tend à augmenter dans la nature en majeure partie à cause de l'industrialisation de notre société. Il pourrait être intéressant de prévoir l'effet de l'augmentation de ces

différents composés sur la photosynthèse et, par exemple, le rendement des plantations agricoles.

Nous pouvons citer, comme exemple spécifique, le cuivre qui est d'un intérêt particulier car des expériences passées ont démontrées qu'il avait un effet sélectif sur la phase J-I. Comme l'origine de cette dernière n'est toujours pas identifiée, il serait intéressant de voir pourquoi le cuivre agit spécifiquement sur la phase J-I. En effet, les sites d'action du cuivre dans le PSII sont déjà bien documentés dans la littérature.

Bref, comme nous pouvons le constater, les possibilités de l'induction de fluorescence sont grandes et loin d'être épuisées. Le développement de nouvelles méthodes d'analyse pratiques, rapides et reproductibles ajoutent encore à l'attrait d'une méthode déjà grandement utilisée dans le milieu de la recherche en photosynthèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Garret H.R., Grisham C.M. (2000) "Biochimie", DeBoeck.
2. Taiz, L., Zeiger, E. (1998) "Plant Physiology", Sinauer Associates, Sunderland, MA.
3. Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schliefer, K.-H. (1992) "The Prokaryotes", Springer-Verlag, Berlin.
4. Bryant, D. A. (1994) "The molecular biology of cyanobacteria", Kluwer Academic Press, Dordrecht.
5. Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1996) "Algae - An introduction to phycology", Cambridge University Press, New York.
6. Horton, R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, D. J., Scrimgeour, K. G. (2002) "Principles of Biochemistry", Prentice Hall, Englewood Cliffs.
7. Albertsson, P. A. (2001) "A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane", Trends Plant Sci. 6: 349-358.
8. Green, B. R., Parson, W. W. (2003) "Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
9. van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T., Sundstrom, V. (1994) "Energy transfer and trapping in photosynthesis", Biochim. Biophys. Acta 1187: 1-65.
10. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. (2004) "Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center", Science 303: 1831-1838.
11. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., Biesiadka, J. (2005) "Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II", Nature 438: 1040-1044.
12. Lazar, D. (2003) "Chlorophyll a Fluorescence Rise Induced by High Light Illumination of Dark-adapted Plant Tissue Studied by Means of a Model of Photosystem II and Considering Photosystem II Heterogeneity", J. Theor. Biol. 220: 469-503.

13. Zhu, X. G., Govindjee, Baker, N., deSturler, E., Ort, D., Long, S. (2005) "Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II", *Planta* 223: 114-133.
14. Rutherford, A. W., Zimmerman, J. L., and Boussac A. (1992) "Oxygen evolution", *in* The photosystems : structure, fonction and molecular biology, Barber, J., éditeur, Cambridge university press, pp 141-167.
15. Brettel, K., , S. E., Witt, H. T. (1984) "Nanosecond reduction kinetics of photooxidized chlorophyll-aII (P-680) in single fleshes as a probe for theelectron pathway, H⁺-release and charge accumulation in the O₂-evolving complex.", *Biochim. Biophys. Acta* 766: 403-415.
16. Crofts, A. R., , B. I., , K. D., Taoka, S. (1993) "Kinetics of Electron Transfer between QA and QB in Wild Type and Herbicide-Resistant Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.", *Z. Naturforsch.* 259-266.
17. Lazar, D., Pospisil, P. (1999) "Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise measured with 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea barley leaves at room and high temperatures", *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 28: 468-477.
18. Jansson, S. (1999) "A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis", *Trends Plant Sci.* 4: 236-240.
19. Calvin, M. (1989) "40 years of photosynthesis and related activities", *Photosynth. Res.* 21: 3-16.
20. Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2003) "Crystal structure of plant photosystem I", *Nature* 426: 630-635.
21. Brettel, K. (1997) "Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I", *Biochim. Biophys. Acta* 1318: 322-373.
22. Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2004) "Alternative Photosystem I-Driven Electron Transport Routes: Mechanisms and Functions", *Photosynth. Res.* V82: 17-33.
23. Dhingra, A., Portis, A. R., Jr., Daniell, H. (2004) "Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants", *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 6315-6320.

24. Skoog, West, Holler (1997) "Chimie Analytique", DeBoeck.
25. Butler, W. L. (1978) "Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis", *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 345-378.
26. El Bissati, K., Delphin, E., Murata, N., Etienne, A.-L., Kirilovsky, D. (2000) "Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms", *Biochim. Biophys. Acta* 1457: 229-242.
27. Lazar, D. (1999) "Chlorophyll a fluorescence induction", *Biochim. Biophys. Acta* 1412: 1-28.
28. Roelofs, T. A., Liang, W., Latimer, M. J., Cinco, R. M., Rompel, A., Andrews, J. C., Sauer, K., Yachandra, V. K., and Klein, M. P. (1996) Oxidation states of the manganese cluster during the flash-induced S-state cycle of the photosynthetic oxygen-evolving complex, 93 ed., pp 3335-3340.
29. Pfundel, E. (1998) "Estimating the contribution of Photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence", *Photosynthesis Research* 56: 185-195.
30. Kautsky, H., Hirsch, A. (1931) "Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation", *Naturwissenschaften* 48: 964.
31. Krause, G. H., Weis, E. (1991) "Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics", *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
32. Lazár, D. (2006) "The polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise measured under high intensity of exciting light", *Funct. Plant Biol.* 33: 9-30.
33. Duysens, Sweers (1963) "Studies on microalga and photosynthetic bacteria", University of Tokyo Press 353-372.
34. Strasser, R. J., Srivastava, A., Govindjee (1995) "Polyphasic Chlorophyll *a* Fluorescence Transient in Plants and Cyanobacteria", *Photochem. Photobiol.* 61: 32-42.
35. Rees, D., Horton, P. (1990) "The mechanisms of changes in Photosystem II efficiency in spinach thylakoids", *Biochim. Biophys. Acta* 1016: 219-227.
36. Samson, G., Prasil, O., Yaakoub, B. (1999) "Photochemical and thermal phases of chlorophyll *a* fluorescence", *Photosynthetica* 37: 163-182.

37. Vernotte, C., Etienne, A. L., Briantais, J.-M. (1979) "Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool", *Biochim. Biophys. Acta* 545: 519-527.
38. Rajagopal, S., Egorova, E. A., Bukhov, N. G., Carpentier, R. (2003) "Quenching of excited states of chlorophyll molecules in submembrane fractions of Photosystem I by exogenous quinones", *Biochim. Biophys. Acta* 1606: 147-152.
39. Vasil'ev, S., Wiebe, S., Bruce, D. (1998) "Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone in spinach thylakoids as a model for antenna based quenching mechanisms", *Biochim. Biophys. Acta* 1363: 147-156.
40. Schreiber, U., Neubauer, C. (1987) "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation", *Z. Naturforsch* 42c: 1255-1264.
41. Mohammed G.H., Binder W.D., Gillies S. (1995) "Chlorophyll fluorescence: A review of its practical forestry applications and instrumentation", *Scand. J. For. Res* 10: 383-410.
42. Strauss, A. J., Kruger, G. H. J., Strasser, R. J., Heerden, P. D. R. (2006) "Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P", *Environmental and Experimental Botany* 56: 147-157.
43. Bukhov, N. G., Govindachary, S., Egorova, E. A., Joly, D., Carpentier, R. (2003) "N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine initiates the appearance of a well-resolved I peak in the kinetics of chlorophyll fluorescence rise in isolated thylakoids", *Biochim. Biophys. Acta* 1607: 91-96.
44. Schreiber, U. (2002) "Assesment of maximal fluorescence yield: Donor-side dependent quenching and QB-Quenching", *in Plant Spectrofluorometry: Applications and Basic Reseach*, Kooten, O. V., Snel, J. F. H., éditeurs, Rozenberg, Amsterdam, pp 23-47.
45. Schansker, G., Toth, S. Z., Strasser, R. J. (2005) "Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP", *Biochim. Biophys. Acta* 1706: 250-261.
46. Joly, D., Bigras, C., Harnois, J., Govindachary, S., Carpentier, R. (2005) "Kinetic analyses of the OJIP chlorophyll fluorescence rise in thylakoid membranes", *Photosynth. Res.* 84: 107-112.

47. Rappaport, F., Cuni, A., Xiong, L., Sayre, R., and Lavergne, J. (2005) Charge recombination and thermoluminescence in photosystem II, 88 ed., pp 1948-1958.
48. Pospisil, P., Dau, H. (2002) "Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients", *Biochim. Biophys. Acta* 1554: 94-100.
49. Vredenberg, W. J., Bulychiev, A. (2003) "Photoelectric effects on chlorophyll fluorescence of photosystem II in vivo. Kinetics in the absence and presence of valinomycin", *Bioelectrochemistry* 60: 87-95.
50. Barthelemy, X., Popovic, R., Franck, F. (1997) "Studies on the O-J-I-P transient of chlorophyll fluorescence in relation to photosystem II assembly and heterogeneity in plastids of greening barley", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol* 39: 213-218.
51. Meunier, P. C., Bendall, D. S. (1992) "Analysis of fluorescence induction in thylakoids with the method of moments reveals 2 different active photosystem-II centers", *Photosynth. Res.* 32: 109-120.
52. Pospisil, P., Tyystjarvi, E. (1999) "Molecular mechanism of high-temperature-induced inhibition of acceptor side of Photosystem II", *Photosynth. Res* 62: 55-66.
53. Pospisil, P., Dau, H. (2000) "Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution", *Photosynth. Res.* 65: 41-52.
54. Bukhov, N. G., Sridharan, G., Egorova, E. A., Carpentier, R. (2003) "Interaction of exogenous quinones with membranes of higher plant chloroplasts: modulation of quinone capacities as photochemical and non-photochemical quenchers of energy in Photosystem II during light-dark transitions", *Biochim. Biophys. Acta* 1604: 115-123.
55. Porra, R. J., Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. (1989) "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous-equations for assaying chlorophyll-a and chlorophyll-b extracted with 4 different solvents - Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic-absorption spectroscopy", *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394.
56. Gauthier, A., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2006) "Interaction of *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine with photosystem II as revealed by thermoluminescence: Reduction of the higher oxidation states of the Mn cluster

and displacement of plastoquinone from the QB niche", *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 1547-1556.

57. Velthuys, B. (1981) "Electron dependent competition between plastoquinone and inhibitors for binding to photosystem II", *FEBS Lett.* 126: 277-281.
58. Wraight, C. (1981) "Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence for a new model of herbicide activity", *Isr. J. Chem.* 21: 348-354.
59. Yaakoubd, B., Andersen, R., Desjardins, Y., Samson, G. (2002) "Contributions of the free oxidized and Q(B)-bound plastoquinone molecules to the thermal phase of chlorophyll-alpha fluorescence", *Photosynth. Res.* 74: 251-257.
60. Srivastava, A., Guisse, B., Greppin, H., Strasser, R. J. (1997) "Regulation of antenna structure and electron transport in Photosystem II of *Pisum sativum* under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a fluorescence transient: OKJIP", *Biochim. Biophys. Acta* 1320: 95-106.
61. Murata, N., Troughton, J. H., Fork, D. C. (1975) "Relationships between the transition of the physical phase of membrane lipids and photosynthetic parameters in *Anacystis nidulans* and lettuce and spinach chloroplasts", *Plant Physiol.* 56: 508-517.
62. Koike, H., Yoneyama, K., Kashino, Y., Satoh, K. (1996) "Mechanism of Electron Flow through the QB Site in Photosystem II. 4. Reaction Mechanism of Plastoquinone Derivatives at the QB Site in Spinach Photosystem II Membrane Fragments", *Plant Cell Physiol.* 37: 983-988.
63. Satoh, K., Oh-hashi, M., Kashino, Y., Koike, H. (1995) "Mechanism of Electron Flow through the QB Site in Photosystem II. 1. Kinetics of the Reduction of Electron Acceptors at the QB and Plastoquinone Sites in Photosystem II Particles from the Cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*", *Plant Cell Physiol.* 36: 597-605.
64. Laidler, K. J. (1997) "Chemical Kinetics", Benjamin-Cummings Publishing Company.
65. Fufezan, C., Rutherford, A. W., Krieger-Liszkay, A. (2002) "Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II", *FEBS Lett.* 532: 407-410.
66. Ishikita, H., Knapp, E. W. (2005) "Control of quinone redox potentials in photosystem II: Electron transfer and photoprotection", *J. Am. Chem. Soc.* 127: 14714-14720.

67. Krieger-Liszkay, A., Rutherford, A. W. (1998) "Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity", *Biochemistry* 37: 17339-17344.
68. Sušila, P., Lazár, D., Ilík, P., Tomek, P., Nauš, J. (2004) "The gradient of exciting radiation within a sample affects the relative height of steps in the fast chlorophyll *a* fluorescence rise", *Photosynthetica* 42: 161-172.
69. Bolhar-Nordenkampf H.R., Long S.P., Baker N.R., Oquist G., Schreiber U., Lechner E.G. (1989) "Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field : a review of current instrumentation", *Functional Ecology* 3: 497-514.
70. Mathis, P. and Paillotin, G. (1981) "Primary processes of photosynthesis", *in* The biochemistry of plants, Hatch, M. D., Boardman, N. K., éditeurs, Academic Press, New York, pp 97-161.
71. Bowes, J., Crofts, A. R., Arntzen, C. J. (1980) "Redox reactions on the reducing side of photosystem II in chloroplasts with altered herbicide binding properties", *Arch. Biochem. Biophys.* 200: 303-308.
72. Zankel, K. L. and Kok, B. (1972) "[19] Estimation of pool sizes and kinetic constants", *in* Methods in Enzymology Photosynthesis and Nitrogen Fixation Part B, Anthony, S. P., éditeur, Volume 24 ed., Academic Press, pp 218-238.
73. Joliot, P., Lavergne, J., Beal, D. (1992) "Plastoquinone compartmentation in chloroplasts .1. Evidence for domains with different rates of photo-reduction", *Biochim. Biophys. Acta* 1101: 1-12.
74. Stirbet A., Govindjee, Strasser, B. J., Strasser, R. J. (1998) "Chlorophyll *a* Fluorescence Induction in Higher Plants] Modelling and Numerical Simulation", *J. Theor. Biol.* 193: 131-151.
75. Strasser, R. J. and Govindjee (1992) "On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*", *in* Research in Photosynthesis, Murata, N., éditeur, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 23-32.
76. Neubauer, C., Schreiber, U. (1987) "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side", *Z. Naturforsch* 42c: 1246-1254.

77. Beauchemin R., Harnois, J., Tajmir-Riahi, H. A., Carpentier R (2007) "Interaction of polyamines with proteins of photosystem II. Cation Binding and photosynthetic oxygen evolution.", J. Mol. Struct. Sous Presse.
78. Boisvert S., Joly, D., Leclerc S., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier R (2007) "Inhibition of the oxygen evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel", BioMetals Sous-presse.
79. Vredenberg, W. J., Bulychiev, A. A. (2002) "Photo-electrochemical control of photosystem II chlorophyll fluorescence in vivo", Bioelectrochemistry 57: 123-128.